



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA DE UM  
PARTICULADO DE DENTINA AUTÓGENA HUMANA  
MINERALIZADA – ESTUDO PILOTO *IN VITRO***

Trabalho submetido por  
**Inês Sofia Maia Jorge dos Anjos**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2018**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA DE UM  
PARTICULADO DE DENTINA AUTÓGENA HUMANA  
MINERALIZADA – ESTUDO PILOTO *IN VITRO***

Trabalho submetido por  
**Inês Sofia Maia Jorge dos Anjos**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Mestre Alexandre Miguel Pereira Oliveira Santos**

e coorientado por  
**Professor Doutor José Américo Almeida de Brito**

**outubro de 2018**



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho de investigação às duas pessoas a quem devo tudo o que tenho e sou hoje, à minha mãe e ao meu avô Adelino.



## **Agradecimentos**

Ao orientador, Mestre Alexandre Santos, um especial agradecimento pelo acompanhamento durante todo este processo de investigação e pelo incansável apoio até nos momentos mais finais deste atribulado processo.

Ao coorientador, Professor Doutor José Brito, pela colaboração durante a realização deste trabalho, de rigor constante.

Ao Professor Doutor Luis Proença, pela incansável disponibilidade no tratamento estatístico dos dados desta investigação.

À Mestre Tânia Fernandes, pela simpatia e colaboração na análise laboratorial das amostras.

Aos meus pais, Anabela e Rui, por me fazerem sempre acreditar nas minhas capacidades, mesmo quando já quase tudo me parece impossível.

Ao meu irmão Pedro que, à sua peculiar maneira, me consegue animar, tranquilizar e descomplicar situações.

Ao meu avô Adelino Jorge. Por tudo e por nada. Onde quer que esteja, tenho a certeza que esteve e sempre estará a olhar e torcer por mim.

À minha avó Irene e à minha tia-avó Hortense por todo o apoio ao longo deste percurso académico.

Aos meus amigos, principalmente às amizades que daqui levo para a vida.





## Resumo

**Objetivos:** Analisar a eficácia da solução básica alcoólica na eliminação bacteriana, bem como a composição inorgânica do particulado de dentina autógena humana mineralizada de várias partes do dente (coroa, raiz e dente completo).

**Materiais e métodos:** Nos laboratórios do Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz, foram triturados dentes pertencentes aos principais grupos dentários (incisivos centrais, laterais, caninos, pré-molares e molares) com recurso ao equipamento “*Smart Dentin Grinder*®” e obtidos 16 particulados, um dos quais utilizado para avaliar a eficácia da solução básica alcoólica “*cleanser*”. Os restantes foram divididos em três grupos, A – coroa triturada, B – raiz triturada e C – dente completo triturado, formando-se, por sua vez, cinco subgrupos em cada um deles. A composição elementar das amostras foi obtida através da análise pelo sistema espectrómetro de fluorescência de raios x por dispersão em comprimento de onda (WDXRF). A análise estatística foi realizada com recurso ao software SPSS, de forma a avaliar a existência de diferenças estatísticas significativas relativamente ao rácio cálcio/fósforo de entre os grupos estudados.

**Resultados:** A eficácia da solução básica alcoólica foi verificada. Existem diferenças estatisticamente significativas no que respeita ao rácio cálcio/fósforo de entre os grupos estudados.

**Conclusão:** Este trabalho de investigação permitiu caracterizar a composição inorgânica do particulado de dentina autógena humana mineralizada dos principais constituintes dentários (coroa e raiz), bem como da sua totalidade. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas em relação ao rácio cálcio/fósforo. São necessários mais estudos “*in vitro*”, de forma a caracterizar a composição inorgânica do particulado de dentina autógena humana mineralizada, aumentando consideravelmente o tamanho da amostra.

**Palavras-chave:** Particulado de dentina autógena; Preservação óssea alveolar; Particulado dentário autólogo; Dentina na engenharia tecidual óssea; Smart Dentin Grinder; WDXRF



## Abstract

**Objectives:** To assess the efficacy of the basic alcoholic solution in bacterial elimination, as well as the inorganic composition of the autogenous human dentin mineralized from various parts of the tooth (crown, root and full tooth) particulate.

**Materials and methods:** In the interdisciplinary research center of investigation Egas Moniz, teeth from the main dental groups (central incisors, lateral incisors, canines, premolars and molars) were grinded using the “*Smart Dentin Grinder*®” equipment and 16 particulates were obtained, one of which was used to evaluate the efficacy of the basic alcoholic solution “*cleanser*”. The remaining particulates were divided into three groups, A – grinded crown, B – grinded root and C – grinded full tooth and five subgroups were created inside each one. The elementary composition of the samples was obtained through the wavelength dispersion x-ray fluorescence spectrometer system (WDXRF) analysis. The statistical analysis used the SPSS software and evaluated the significant differences between the calcium/phosphorus ratio in the studied groups.

**Results:** The efficacy of the basic alcoholic solution was verified. There were statistical differences in the calcium/phosphorus ratio in the studied groups.

**Conclusion:** This research paper allowed for the characterization of the inorganic composition of the autogenous human dentin mineralized from the main dental elements (crown and root) as well as the full tooth particulate. Significant statistical differences were found regarding the calcium/ phosphorus ratio. More “*in vitro*” studies are required to characterize the inorganic composition of mineralized human autogenous dentine particule, greatly increasing the sample size.

**Keywords:** Autogenous dentin graft; alveolar bone preservation; autogenous tooth bone graft; dentin in bone tissue engineering; Smart Dentin Grinder; WDXRF



## Índice Geral

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	13
1. Anatomia do osso alveolar	13
2. Preservação alveolar	14
3. Regeneração óssea	17
3.1. Cicatrização do osso alveolar	18
3.2. Regeneração óssea guiada	20
3.3. Enxertos ósseos	22
4. Autoenxertos	24
5. Dentina na regeneração do osso alveolar	26
5.1. Estrutura e composição dentinária	26
5.2. Dentina e osso alveolar	28
5.3. Métodos de processamento da dentina	29
5.3.1. Eliminação das proteínas não colagénicas	29
5.3.2. Desmineralização	29
5.3.3. Eliminação da matriz orgânica	30
5.3.4. Dentina inalterada	30
6. Evidência científica	32
<b>II. OBJETIVOS</b>	47
1. Objetivos do estudo	47
2. Hipóteses de estudo	47
2.1. Primeira fase de estudo	47
2.2. Segunda fase de estudo	47
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	49
1. Tipo de estudo	49
2. Local de realização do estudo	49
3. Amostra	49
4. Materiais	49
5. Grupos de estudo	50
6. Protocolo experimental	50
<b>IV. RESULTADOS</b>	57
1. Determinação da eficácia da solução básica alcoólica na eliminação bacteriana	57
2. Determinação da composição elementar das amostras analisadas	58
3. Metodologia de análise estatística	61

4. Caracterização estatística da amostra .....	61
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
1. Relevância do tema estudado.....	67
2. Análise do estudo executado .....	68
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>VII.PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>73</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>75</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Remoção dos tecidos periodontais com recurso a broca de carbide de tungsténio. ....	50
<b>Figura 2</b> – Equipamento “ <i>Smart Dentin Grinder</i> ®”. ....	51
<b>Figura 3</b> – Dente na câmara de trituração da “ <i>Smart Dentin Grinder</i> ®”. ....	51
<b>Figura 4</b> – Compartimentos inferior (à esquerda) e superior (à direita) do equipamento “ <i>Smart Dentin Grinder</i> ®”. ....	52
<b>Figura 5</b> – Particulado de dentina autógena mineralizada, nos respetivos frascos, de acordo com os grupos estipulados para este trabalho de investigação. ....	52
<b>Figura 6</b> – Copo de amostra de polietileno, devidamente preparados com a película de filme capaz de suportar as amostras, devidamente encerrado e posicionado. ....	54
<b>Figura 7</b> – Aparelho WDXRF (Modelo S4 Pionner, da marca Bruker). ....	54
<b>Figura 8</b> – Porta-amostras dispostos no tabuleiro do aparelho WDXRF. ....	55
<b>Figura 9</b> – Porta-amostras transportados até à câmara de análise. ....	55
<b>Figura 10</b> – Meio de cultura de gelose sangue após 48 horas de incubação. ....	57
<b>Figura 11</b> – Ação da solução de desinfecção imediatamente após a colocação da mesma (A), 3 minutos após (B) e 10 minutos após (C). ....	57
<b>Figura 12</b> - Espectro de emissão relativo aos elementos cálcio e fósforo, presentes nas amostras A1 e B1. ....	60
<b>Figura 13</b> – Gráfico de valores médios dos grupos A, B e C relativamente à percentagem de cálcio. ....	63
<b>Figura 14</b> – Gráfico de valores médios dos grupos A, B e C relativamente à percentagem de fósforo. ....	63
<b>Figura 15</b> – Diagramas de extremos e quartis referentes aos valores do rácio Ca/P. ....	64





## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Fatores de crescimento no processo de cicatrização do osso alveolar (Lang & Lindhe, 2010). .....	20
<b>Tabela 2</b> – Características dos materiais de enxerto na ROG (Tang et al., 2016). .....	23
<b>Tabela 3</b> – Estudos clínicos efetuados em humanos com aplicação de dentina como biomaterial de regeneração (Khanijou et al., 2018; Tabatabaei et al., 2016) .....	32
<b>Tabela 4</b> – Grupos de estudo. ....	50
<b>Tabela 5</b> – Massa dos elementos cálcio e fósforo, relativamente à massa da amostra, em ppm e percentagem, de cada um dos subgrupos, obtidos após análise pelo sistema espectrómetro de raios x por dispersão em comprimento de onda. ....	59
<b>Tabela 6</b> – Rácio de cálcio/fósforo em cada um dos subgrupos. ....	60
<b>Tabela 7</b> – Estatística descritiva das percentagens de cálcio e fósforo segundo os grupos estudados. ....	62
<b>Tabela 8</b> - Teste Kruskal-Wallis para identificação de diferenças estatísticas entre grupos, relativamente ao rácio cálcio/fósforo. ....	64
<b>Tabela 9</b> – Teste de Dunn com correção de Bonferroni para identificação de diferenças estatísticas entre grupos, relativamente ao rácio cálcio/fósforo .....	65



## **Lista de Siglas**

**ABTB** - matriz de dentina desmineralizada em bloco

**ACP** – fosfato de cálcio amorfo

**ADDM** - matriz de dentina autógena desmineralizada

**ALP** – fosfatase alcalina

**APDDM** - matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada

**ATG** - particulado dentário autógeno

**AutoBT<sup>®</sup>** - material de enxerto ósseo de dente autógeno

**BMP-2** – proteína morfogénica óssea 2

**BMP-4** – proteína morfogénica óssea 4

**BMP-7** – proteína morfogénica óssea 7

**BMPs** – proteínas morfogénicas ósseas

**BSP** – sialoproteína óssea

**cFMS** – recetor estimulador de colónias

**DA** – aloenxerto de dentina

**DCPD** – dicálcio fosfato dihidratado

**DDM** - particulado de dentina autógena desmineralizada

**DMP 1** – proteína da matriz dentinária 1

**DMP** – proteína específica da dentina

**DPP/ DMP 2** – fosfoproteína da dentina

**DSP** – sialoproteína da dentina

**EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético

**EGF** – fator de crescimento epidermóide

**e-PTFE** – politetrafluoroetileno na forma expandida

**FDBA** - particulado alógeno de osso liofilizado

**FGF-2** – fator de crescimento fibroblástico 2

**FGF-7** – fator de crescimento fibroblástico 7

**HA** – hidroxiapatite

**IGF-1**– fator de crescimento “*insuline like*” 1

**IGF-2**– fator de crescimento “*insuline like*” 2

**ISQ** - quociente de estabilidade implantar

**M-CSF** – fator estimulante de colônias de macrófagos

**MTA** - agregado trióxido mineral

**NaOH** – hidróxido de sódio

**NCPs** – proteínas não colagénicas

**OCP** – octacálciofosfato

**OPG** – osteoprotegerina

**PBS** – solução salina tampão

**PDGF** – fator de crescimento derivado das plaquetas

**PTFE** – politetrafluoroetileno

**RANK** – recetor ativador do fator nuclear kappa B

**RANKL** - ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B

**ROG** – regeneração óssea guiada

**TC** – tomografia computadorizada

**TCP** – tricálciofosfato

**TGF-1 $\beta$**  – fator de crescimento tumoral beta 1

**TGF- $\beta$**  – fator de crescimento tumoral beta

**VEGF** – fator de crescimento vascular epitelial

**WTA** – autoenxerto correspondente à totalidade do dente

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Anatomia do osso alveolar

O processo alveolar pode ser definido como o tecido ósseo que cinge o dente totalmente erupcionado, desenvolvendo-se simultaneamente com este (Araújo, Silva, Misawa, & Sukekava, 2015; Jambhekar, Kernén, & Bidra, 2015).

As características morfológicas do processo alveolar relacionam-se com o volume e forma do dente, controlado pelo seu eixo e inclinação (Araújo et al., 2015; Khanijou, Seriwatanachai, Boonsiriseth, & Suphangul, 2018).

O desenvolvimento do osso alveolar decorre de uma fase embrionária. Provenientes do tubo neural do embrião, as células da crista neural possuem alta capacidade de regeneração e persistem nos tecidos adultos (Lang & Lindhe, 2015; Nampo et al., 2010).

Tecido conjuntivo mineralizado, altamente dinâmico, o osso alveolar apresenta um distinto processo de formação, degradação e remodelação. A matriz orgânica é o seu componente *major*, 95% da qual é construída por colagénio do tipo I, correspondendo os restantes 5% aos proteoglicanos e outras proteínas não colagénicas (NCPs) (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-cerri, Simões, & Cerri, 2015; Wiesmann, Lüttenberg, & Meyer, 2007).

O material inorgânico ósseo consiste predominantemente em iões cálcio e fosfato. Não obstante, estão também presentes significativas quantidades de bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbono, fluorite, zinco, bário e estrôncio (Florencio-Silva et al., 2015).

Exibe quatro tipos celulares principais: osteoblastos, células ósseas de revestimento, osteócitos e osteoclastos (Florencio-Silva et al., 2015).

Os osteoblastos são células cuboídes, localizados ao longo da superfície óssea, francamente associados à formação deste tecido. Derivam das células estaminais mesenquimatosas que, através da linhagem osteoprogenitora, adquirem a expressão de genes específicos, incluindo a síntese de proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) (Florencio-Silva et al., 2015).

A síntese da matriz óssea pelos osteoblastos ocorre em duas etapas principais: a deposição da matriz orgânica e a sua consequente mineralização. Primeiramente, os

osteoblastos segregam proteínas colagénicas (maioritariamente de colagénio tipo I), NCPs e proteoglicanos, que formam a matriz orgânica. Seguidamente, os osteoblastos segregam enzimas que degradam os proteoglicanos, pelo que os iões cálcio são libertados pelos últimos, atravessando os canais de cálcio presentes na matriz. Por outro lado, há segregação da fosfatase alcalina (ALP) pelos osteoblastos, que degrada os compostos fosfatados, libertando os iões fosfato dentro de vesículas da matriz. Nesse local, os iões cálcio e fosfato formam os cristais de hidroxiapatite (Florencio-Silva et al., 2015).

No que diz respeito às células ósseas de revestimento, as suas funções ainda não são completamente conhecidas. Sabe-se que previnem a interação entre os osteoclastos e a matriz óssea e que participam na diferenciação dos osteoclastos, produzindo osteoprotegerina (OPG) e ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (Florencio-Silva et al., 2015).

Os osteócitos são as células mais abundantes, compreendendo 90-95% da totalidade das células ósseas. De morfologia dendrítica, estão localizados dentro de lacunas, rodeadas por matriz óssea mineralizada. Derivam da linhagem das células estaminais mesenquimatosas, através da diferenciação dos osteoblastos (Florencio-Silva et al., 2015).

Os osteoclastos são originários das células mononucleares das células-tronco hematopoiéticas, sob influência de vários fatores, entre os quais o fator estimulante de colónias de macrófagos (M-CSF) e o RANKL. Coadunados, estes agentes promovem a ativação dos fatores de transcrição e a expressão génica nos osteoclastos. O M-CSF liga-se ao seu recetor estimulador de colónias (cFMS), presente nos precursores deste tipo celular, estimulando a sua proliferação e inibindo a apoptose. O RANKL é um fator crucial na osteoclastogénese porque, uma vez ligado ao seu recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) é induzida a formação de osteoclastos (Florencio-Silva et al., 2015).

## **2. Preservação alveolar**

As estratégias de preservação alveolar, adequadas a minimizar a perda de volume ósseo que tipicamente sucede à extração dentária, têm sido amplamente utilizadas desde

o passado (Avila-Ortiz, Elangivan, Kramer, Blanchette, & Dawson, 2014; Jung, Ioannidis, Hämmerle, & Thoma, 2018).

A extração dentária é um dos procedimentos médico-dentários mais comuns. Os dentes têm indicação para extração quando estes estão severamente destruídos, não podendo ser restaurados, ou afetados por doença periodontal, lesões patológicas que requerem excisão, necrose pulpar ou lesões periapicais sobre as quais o tratamento endodôntico é efetuado, mas por alguma razão o dente acaba por ter de ser extraído (Khanijou et al., 2018).

As extrações dentárias alteram as dimensões da crista alveolar, tendo como causas principais o trauma dos tecidos durante o procedimento e a perda do ligamento periodontal (Dayakar, Waheed, Bhat, & Gurpur, 2018).

Desta forma, foram desenvolvidas técnicas de prevenção à reabsorção alveolar, nomeadamente extrações atraumáticas, preservação do alvéolo com material regenerativo ou colocação imediata de implantes, prevenindo o colapso das paredes corticais e manutenção da sua dimensão (Dayakar et al., 2018).

A extração dentária inicia uma série de processos reparativos que envolvem tanto os tecidos duros (osso alveolar) com os tecidos moles (ligamento periodontal e gengiva). A literatura subdivide a preservação alveolar em três fases: cicatrização dos tecidos moles, seis a oito semanas após a extração; cicatrização dos tecidos duros e moles, quatro a seis meses após a extração; cicatrização dos tecidos duros, seis meses após o processo de extração (Jambhekar et al., 2015; Jung et al., 2018).

O processo de cicatrização do alvéolo correspondente ao dente extraído resulta em alterações significativas da crista alveolar. A perda de volume alveolar pós-extração é um processo irreversível que envolve redução seja em termos de dimensão horizontal como vertical (Avila-Ortiz et al., 2014; Binderman, Hallel, & Leretter, 2017).

A redução da dimensão vertical varia entre os 11-22% ( $-1,24 \pm 0,11$  mm), seis meses após a intervenção, ao passo que a redução da dimensão horizontal é mais significativa, com valores entre os 29% e 36% ( $-3,79 \pm 0,23$  mm), no mesmo período temporal (Jung et al., 2018).

A perda óssea é mais acentuada nos primeiros três meses após a extração, apresentando uma redução de 50% ao fim de 12 meses e continuando durante vários anos, embora de uma forma mais lenta (Binderman et al., 2017).

Os fatores sistêmicos, bem como os locais, têm impacto na perda óssea pós-extração, pelo que uma inadequada vascularização e resposta inflamatória são indicados como os fatores causais da reabsorção óssea alveolar (Atieh et al., 2015; Morjaria, Wilson, & Palmer, 2012).

O primeiro ato clínico executado para prevenção do osso alveolar foi a retenção de raízes dentárias, com o objetivo de potenciar a estabilidade das próteses removíveis. Vários estudos mostraram que a manutenção da raiz no interior do alvéolo, desprovido de coroa dentária, vital ou endodonticamente reabilitada, era capaz de preservar o osso alveolar. Porém, por situações de lesões cariosas, fraturas e/ou razões estratégicas, esta solução nem sempre se revelou favorável (Dayakar et al., 2018; Grace & Ganapathy, 2016).

Em meados da década de 80, surgiu uma técnica alternativa à referida anteriormente, que consistia no preenchimento alveolar com biomaterial que simulava a raiz dentária, promovendo igualmente a preservação óssea (Grace & Ganapathy, 2016).

Esta técnica de preservação óssea alveolar tem como motivos principais a manutenção do volume ósseo, potenciando questões funcionais e estéticas, mantendo igualmente a arquitetura dos tecidos moles, sem que sejam necessários adicionais procedimentos cirúrgicos (Hämmerle, Araújo, Simin, & Araújo, 2012).

Porém, existem contraindicações à prática das técnicas de preservação alveolar, comuns às contraindicações de outras intervenções dentárias de componente cirúrgica, sendo: (i) tratamento farmacológico com bifosfonatos, (ii) tratamento oncológico por radioterapia na zona que necessita ser intervencionada e (iii) presença de infecção no local de intervenção, que não possa ser eliminada aquando o ato cirúrgico (Hämmerle et al., 2012)

Desta forma, a preservação do volume alveolar dentro dos mesmos valores que se verificavam no momento da extração tem sido a principal preocupação da Medicina Dentária contemporânea. Extrações atraumáticas, preservação do alvéolo com materiais de enxerto ósseo e colocação imediata de implantes dentários impedem o colapso das paredes corticais e mantêm as dimensões do alvéolo (Avila-Ortiz et al., 2014; Dayakar et al., 2018; Hämmerle et al., 2012).



### 3. Regeneração óssea

O tecido ósseo possui capacidade de autorreparação e regeneração. Porém, quando existem grandes defeitos ósseos causados por um trauma significativo ou em casos de doenças sistêmicas, fraturas patológicas (em consequência de metástases), inflamação óssea ou dos tecidos circundantes, ou uma irrigação sanguínea comprometida, a capacidade de adequada autorreparação pode falhar (Tang et al., 2016).

A estrutura e função do periodonto durante a sua regeneração e cicatrização é determinada pelo arranjo de proteínas bioativas fundamentais, entre as quais o fator de crescimento derivados das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento vascular epitelial (VEGF), o fator de crescimento epidermoide (EGF), as BMPs, o fator de crescimento “*insuline-like*” – 1 (IGF-1) e o fator de crescimento tumoral beta – 1 (TGF-1 $\beta$ ) (Lang & Lindhe, 2015).

A capacidade reparadora do tecido ósseo providenciou o desenvolvimento de estratégias paradigmáticas relativamente à engenharia tecidual, gerando novas opções de tratamento (Tang et al., 2016).

Atualmente, os enxertos ósseos permanecem como pilar fundamental para o tratamento dos defeitos ósseos. O material de enxerto é aquele que promove a cicatrização óssea, de forma isolada ou em combinação com outros materiais, sendo as suas propriedades biológicas e efeitos clínicos classificados pelos termos osteocondução, osteoindução e osteogenicidade (Morjaria et al., 2012; Tang et al., 2016).

A osteocondução é um dos mais importantes pré-requisitos dos biomateriais utilizados na regeneração óssea. É a capacidade de suportar a formação de novo osso, permitindo a migração, proliferação, diferenciação e deposição das células osteoprogenitoras da matriz extracelular no interior dos defeitos ósseos (Yu, Tang, Gohil, & Laurencin, 2015).

A propriedade dos biomateriais que induz diretamente a formação óssea é denominada osteoindução. Os biomateriais que possuem esta característica desempenham um importante papel na formação óssea a diversos níveis: (i) ao nível dos tecidos, facilitam a nutrição e o aporte de oxigénio, promovendo a vascularização do local intervencionado, essencial para o crescimento de novo osso; (ii) a nível celular, desencadeia as células osteoprogenitoras, através da linhagem osteogénica; (iii) a nível

molecular, os materiais com propriedades osteindutivas são capazes de concentrar as BMPs, dada a sua alta afinidade pelas mesmas (Yu et al., 2015).

A osteogenicidade diz respeito à formação de novo osso a partir das células vivas transplantadas no conteúdo do enxerto ósseo (Morjaria et al., 2012).

### 3.1. Cicatrização do osso alveolar

O processo de cicatrização do osso alveolar ocorre em três fases sequenciais: fase inflamatória, fase proliferativa e fase modeladora/remodeladora (Araújo et al., 2015; Lang & Lindhe, 2015).

A fase inflamatória pode ser fracionada em duas partes: formação de um coágulo sanguíneo e a migração das células inflamatórias (Araújo et al., 2015).

Logo após a extração dentária, desencadeia-se um momento hemorrágico no alvéolo, originando-se um coágulo. Neste ponto, ocorre a migração de um elevado número de células inflamatórias (predominantemente neutrófilos e monócitos) para a zona intervencionada, por ação de fatores de crescimento. Estas células eliminam bactérias e tecido necrosado, numa ação fagocitária (Araújo et al., 2015; Lang & Lindhe, 2015).

Ao fim de três dias, a fase inflamatória termina. Os macrófagos migram para a zona da lesão, contribuindo para o processo de salubridade, por fagocitose dos eritrócitos e leucócitos polimorfonucleares usados. Aditivamente, os macrófagos libertam moléculas biologicamente ativas, como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, fibroblastos e células endoteliais, que desempenham um papel essencial na transição para a fase de granulação (Lang & Lindhe, 2015)

A fase proliferativa pode, também, ser subdividida em duas partes: fibroplasia e formação de osso imaturo (Araújo et al., 2015).

A fibroplasia envolve uma rápida descensão de matriz provisória. Seguidamente, essa matriz provisória é penetrada por diversos vasos e células osteoformadoras, desenvolvendo-se osso imaturo em redor desses vasos, formando assim o “*osteon*” primário (Araújo et al., 2015).

O osso imaturo pode permanecer no alvéolo cerca de duas semanas após a extração dentária, apresentando-se dessa forma durante algumas semanas. No entanto, o

seu carácter é provisório, uma vez que não tem qualquer capacidade de suporte de carga, e por isso necessita ser substituído por osso maduro (Araújo et al., 2015).

Por fim, a fase modeladora/remodeladora. A modelação óssea compreende a alteração da forma e arquitetura do tecido ósseo, ao passo que na fase remodeladora existem alterações, mas sem interferência na forma e arquitetura. Este processo pode decorrer durante vários meses, diferindo substancialmente entre indivíduos (Araújo et al., 2015).

Os osteoclastos migram para as paredes do alvéolo, ocorrendo modelação óssea tanto na parede vestibular como na parede palatina/lingual. Contudo, uma vez que a parede lingual/palatina é mais volumosa do que a vestibular, a modelação é mais significativa nesta última. Além disso, o processo de modelação é mais precoce do que a remodelação, de tal forma que dois terços do processo modelativo ocorrem nos primeiros três meses de cicatrização (Araújo et al., 2015).

O processo de cicatrização do osso alveolar é regulado por citoquinas e fatores de crescimento (tabela 1), que iniciam a migração, diferenciação e proliferação celular, interagindo entre si, numa sequencia temporal e espacial altamente ordenada, atuando como sinais mitogénicos e angiogénicos nos estádios primários da cicatrização óssea (Araújo et al., 2015).

Sintetizando, os processos de modelação e remodelação resultam em alterações qualitativas e quantitativas da zona edêntula, que culminam numa redução das dimensões da crista óssea (Araújo et al., 2015).

Tabela 1 – Fatores de crescimento no processo de cicatrização do osso alveolar (Lang & Lindhe, 2010).

<b>Fase de cicatrização</b>	<b>Fatores de crescimento</b>
Inflamatória	PDGF TGF- $\beta$ VEGF
Proliferativa	EGF FGF-2 e 7 PDGF TGF- $\beta$ VEGF
Modeladora/remodeladora	BMP-2, 4 e 7 FGF-2 IGF-2 PDGF TGF- $\beta$ VEGF

### 3.2. Regeneração óssea guiada

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é considerada um dos métodos mais comumente utilizados na reconstrução dos defeitos do osso alveolar (Elgali, Omar, Dahlin, & Thomsen, 2017).

A reabsorção óssea após extração leva a perda de função e cria dificuldades na reabilitação implantar e prostodontica. A necessidade de contornar estas complicações despertou um significativo interesse no desenvolvimento de técnicas e biomateriais que conseguissem prevenir a reabsorção óssea (Leblebicioglu et al., 2013).

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) tem sido amplamente utilizada como forma de superar os problemas anatômicos e a insuficiente quantidade de osso alveolar. Os atuais protocolos de regeneração guiada incluem enxertos autógenos, aloenxertos, xenoenxertos, enxertos aloplásticos e membranas de diversas origens (Leblebicioglu et al., 2013; Lee, Lee, & Kim, 2013).

O uso de membranas, na ROG, mostra-se vantajoso, na medida em que o material de enxerto deve ser protegido por uma membrana, por forma a garantir que o processo é previsível (Kosinski, 2017; Lee et al., 2013).

A seleção da membrana apropriada para a ROG deve respeitar certos critérios, entre eles a biocompatibilidade, a integração pelos tecidos, a oclusividade celular, a capacidade de manutenção do espaço e o manuseamento clínico adequado (Benic & Hämmerle, 2014; Elgali et al., 2017).

As membranas podem ser classificadas como não reabsorvíveis ou reabsorvíveis (Benic & Hämmerle, 2014).

As membranas não reabsorvíveis, nomeadamente de politetrafluoroetileno (PTFE), na sua forma expandida (e-PTFE), constituem a primeira geração de membranas usadas no procedimento de ROG. Este material é um polímero sintético, de estrutura porosa, que não induz reações imunológicas, resistindo à degradação enzimática. No geral, este tipo de membranas demonstram biocompatibilidade e capacidade de manutenção do espaço. Contudo, necessitam de uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção (Benic & Hämmerle, 2014; Elgali et al., 2017).

Foi então desenvolvida uma segunda geração de membranas, de carácter reabsorvível. O facto de não necessitarem de uma segunda intervenção cirúrgica, terem um melhor custo benefício e diminuírem a morbilidade do paciente tornam-nas mais vantajosas (Benic & Hämmerle, 2014).

Os uso de membranas nos defeitos ósseos, juntamente com materiais de enxertos e substitutos ósseos, são comumente utilizados, por forma a providenciar suporte estrutural ao defeito e promover o potencial regenerativo dos tecidos (Elgali et al., 2017).

Hoje em dia, a ROG implica o uso de diferentes tipos de membranas (reabsorvíveis e não-reabsorvíveis), em conjugação com os diferentes materiais de preenchimento dos defeitos. A escolha dos materiais depende amplamente do tamanho e configuração do defeito ósseo (Elgali et al., 2017).

### 3.3. Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos utilizados na engenharia tecidual devem assemelhar-se à morfologia do osso alveolar, por forma a serem lentamente degradados à medida que são substituídos por novo osso (Wiesmann et al., 2007).

A viabilidade dos tecidos, as dimensões do defeito ósseo, a forma, tamanho e volume do enxerto, bem como a sua manipulação, as propriedades biomecânicas e o custo são alguns dos fatores que influenciam a seleção do material de enxerto ósseo ideal (Tang et al., 2016).

Os enxertos consistem numa estrutura sólida de suporte, capaz de sustentar a colonização, proliferação, diferenciação e migração celulares. Devem possuir propriedades físico-químicas apropriadas, necessárias à formação tecidual, além de conseguir resistir e responder a estímulos mecânicos. Deve ser biocompatível e apresentar osteocondutividade, ser biodegradáveis, apresentar propriedades semelhantes ao osso alveolar e uma porosidade ideal (Tabela 2) (Benic & Hämmerle, 2014; Tang et al., 2016).

Tabela 2 – Características dos materiais de enxerto na ROG (Tang et al., 2016).

<b>Biocompatibilidade</b>	Capacidade do enxerto de suportar a atividade celular normal. O enxerto ósseo ideal é osteocondutivo, osteoindutivo e osteogénico, permitindo a formação de novos vasos sanguíneos em apenas algumas semanas após a colocação.
<b>Bioreabsorção</b>	A degradação do enxerto, com o tempo, preferencialmente com uma taxa de reabsorção controlada, é necessária para criar espaço para o crescimento de novo tecido ósseo. A taxa de reabsorção pode variar de acordo com a aplicação requerida.
<b>Similaridade mecânica</b>	O suporte ósseo ideal deve corresponder às propriedades do osso do hospedeiro, como resposta à transferência da carga e suporte do stress mecânico.
<b>Tamanho dos poros e porosidade</b>	Este é um ponto crítico no que toca à difusão dos nutrientes e oxigénio, para a sobrevivência e proliferação celular. O tamanho dos poros entre 200 a 350 $\mu\text{m}$ revela-se o ideal para o crescimento dos tecidos ósseos. Os enxertos multi-porosos (micro e macro porosidades) são melhores que os enxertos macro-porosos, permitindo a adesão e invasão celulares, de acordo com os estudos elaborados. Contudo, um aumento da porosidade reduz a resistência mecânica do material de enxerto.

Clinicamente, existem quatro categorias de materiais de enxerto: autoenxertos, aloenxertos, enxertos aloplásticos e xenoenxertos. Com estes quatro tipos de materiais disponíveis, a escolha depende maioritariamente da aplicação clínica e do volume do defeito (Sarala, Chauhan, Sandhya, Dharmendra, & Mitra, 2018).

Os autoenxertos são um material de enxerto que é colhido do próprio indivíduo, de zonas intra ou extra orais. Do ponto de vista biológico, este é considerado o “*gold standard*”, dada a total carência de imunogenicidade e das suas propriedades osteogénicas, osteoindutoras e osteocondutoras. No entanto, também apresenta desvantagens, entre elas o volume limitado de material e a morbilidade do paciente (Benic & Hämmerle, 2014; Y.-K. Kim et al., 2010; Oryan, Alidadi, Moshiri, & Maffulli, 2014; Tang et al., 2016).

Os aloenxertos advêm de um outro indivíduo de espécie comum, podendo ser obtidos de cadáveres ou dadores vivos. Biologicamente, possuem características osteocondutivas e osteoindutivas. Porém, dada a viabilidade celular, têm um baixo potencial osteogénico. O risco de transmissão de doenças, o custo e o risco de rejeição são algumas das desvantagens (Oryan et al., 2014; Tang et al., 2016; Yu et al., 2015).

O xenoenxertos, também denominados heteroenxertos, são passíveis de obter a partir de indivíduos de uma espécie diferente. Apresentam as mesmas características, vantajosas ou não, que os aloenxertos (Benic & Hämmerle, 2014; Jambhekar et al., 2015).

Os materiais aloplásticos são produzidos sinteticamente, permitindo incorporar fatores de crescimento e células da medula, podendo ser construídos à medida dos defeitos. As propriedades mecânicas são limitadas (Tang et al., 2016).

A necessidade de criar um material de enxerto ósseo, capaz de uma notável cicatrização, surge de forma a tornar possível a ultrapassagem das limitações dos materiais de origem biológica e sintética, anteriormente descritos.

#### **4. Autoenxertos**

Existem vários materiais de enxerto ósseo, usados para preservar ou regenerar o osso alveolar. No entanto, o material de enxerto ósseo autógeno é considerado o “*gold standard*”, dadas as propriedades osteogénicas, osteoindutivas e osteocondutivas, rápida cicatrização e ligeira rejeição imunológica. Contudo, dada a sua limitada disponibilidade, rápida reabsorção, defeitos locais, e a morbilidade provocada pelas colheitas ósseas extra-orais (caso fosse necessário uma quantidade significativa de osso), levanta obstáculos à utilização deste tipo de material (Khanijou et al., 2018; S.-Y. Kim et al., 2017).

Posto isto, muitos clínicos começaram a mostrar preferência pelos aloenxertos, xenoenxertos e materiais aloplásticos, dados os resultados obtidos pelo uso deste tipo de materiais, em comparação com os resultados supramencionados (Khanijou et al., 2018).

Contudo, também os materiais de origem não-autógena começaram a demonstrar alguma debilidade. Os aloenxertos são dispendiosos e têm um elevado risco de infeção uma vez que as informações sobre o dador são restritas ou até inadequadas. O uso de xenoenxertos, para além de poderem ser, igualmente, uma fonte de transmissão de



doenças, levantam problemas éticos e religiosos, dada a sua origem animal. Os materiais aloplásticos são desprovidos de propriedades osteogénicas e osteoindutivas. Estas limitações levaram ao desenvolvimento de um material processado a partir de dentes de origem humana (Khanijou et al., 2018).

Após a confirmação de que a manutenção da raiz no alvéolo, para conservação do volume ósseo da crista, tem uma excelente compatibilidade com os tecidos ósseos (criando-se uma interface anquilosante entre as superfícies óssea e dentária), começaram a ser desenvolvidos os materiais de enxerto autógeno de origem dentária (Calvo-Guirado et al., 2018; Sarala et al., 2018).

Após as experiências de Kim et al. em 1993, o particulado dentinário tem vindo a ser alvo de estudo, após as suas constatações acerca da presença de hidroxiapatite e fosfato beta-tricálcico, ambos de propriedades osteocondutivas e de excelente biocompatibilidade. O uso de enxerto ósseo proveniente de dente autógeno tem vindo a aumentar, sendo usado após extração, processamento e trituração do dente (Jo, Kim, & Choi, 2018; Sarala et al., 2018).

O dente tem uma elevada quantidade de componente orgânica, preservada mesmo após extração ao fim de um longo período, dada a apatite sólida externa do dente, que protege a componente orgânica interna por um longo período (Sarala et al., 2018).

Existem vários aspetos éticos e biológicos associados à produção de material de enxerto dentinário autógeno. Os dentes extraídos são considerados lixo biológico. No entanto, caso o doente concorde com o processo, o uso do(s) seu(s) dente(s) não é ilegal (Sarala et al., 2018).

Os materiais de enxertos ósseo de dente autógeno podem surgir com duas conformações: compactado ou em grânulos. O material do tipo compactado tem capacidades osteoindutivas, dada a sua molhabilidade sanguínea, e osteocondutivas, devido à capacidade de manutenção do espaço, aliada à sua capacidade de substituição dissimulada (Sarala et al., 2018)

Uma vez que se trata de um material autógeno, o risco de reações de corpo estranho é desprezado. Podem ser utilizados na regeneração tecidular guiada, preservação do alvéolo após extração, aumento da crista óssea alveolar e cirurgia de elevação do seio maxilar (Sarala et al., 2018)

## **5. Dentina na regeneração do osso alveolar**

A dentina é um biomaterial versátil, usado na engenharia tecidual, servindo tanto como material de enxerto como uma fonte rica em fatores de crescimento semelhantes ao osso e BMPs (Sarala et al., 2018; Tabatabaei, Tatari, Samadi, & Moharamzadeh, 2016).

Num dente que tenha sofrido uma situação traumática observa-se uma aquilose da(s) raiz(es), sofrendo contínua reabsorção ao longo do tempo e substituição por osso, reabsorvendo eventualmente a totalidade da raiz e conservando o processo alveolar (Calvo-Guirado et al., 2018).

Vários estudos revelam que, após a extração de um dente do seu processo alveolar, decorre uma alteração da dimensão e estrutura óssea, até por vezes atrofia, revelando-se a sua regeneração num enorme desafio (Khanijou et al., 2018).

Dadas as semelhanças entre os tecidos ósseos e dentários em termos de composição bioquímica, os dentes começaram a ser usados como material de enxerto ósseo (Khanijou et al., 2018).

A técnica de regeneração óssea, com recurso a um particulado de dentina, demonstra uma excelente capacidade de regeneração, bem como no que diz respeito à inexistência de antigenicidade, doenças genéticas e transmissão de outro tipo de enfermidades (Sarala et al., 2018).

### **5.1. Estrutura e composição dentinária**

Os tecidos dentários compreendem uma combinação entre esmalte e dentina, de composição e estrutura distintas, predominantemente compostos por cristais de hidroxiapatite (Chun, Choi, & Lee, 2014; Teruel, Alcolea, Hernández, & Ruiz, 2015).

O esmalte é o tecido mais duro do corpo humano, dada a pequena percentagem de água que o compõe (4%). Estruturalmente, o esmalte cobre a totalidade da coroa anatómica e protege a dentina (Chun et al., 2014). Apresenta uma estrutura cristalina altamente mineraliza, sendo a hidroxiapatite o mineral mais abundante (90-92%) (Heymann, Swift, & Ritter, 2013).

Mais dura que o osso, mas menos do que o esmalte, fisiológica e anatomicamente, a dentina é uma estrutura complexa, sendo o componente mais

volumoso dos dentes (compreende mais de 85% da sua estrutura) (Binderman, Hallel, Nardy, Yaffe, & Sapoznikov, 2014; Chun et al., 2014; Goldberg, Kulkarni, Young, & Boskey, 2011; Tjäderhane, Carrilho, Breschi, Tay, & Pashley, 2009).

Este tecido é composto por 70% de minerais, 20% de compostos orgânicos e 10% de água. Contudo, a distribuição destes componentes é variável nas diferentes partes da dentina (Neel et al., 2016; Tabatabaei et al., 2016)

O dente é conhecido pela sua composição orgânica-inorgânica híbrida, composto por cálcio-fosfatos com colagénio e outro tipo de compostos orgânicos. Os minerais consistem em cinco tipos de cálcio fosfato: hidroxiapatite (HA), tricálciofosfato (TCP), octacálcio fosfato (OCP), fosfato de cálcio amorfo (ACP) e dicálcio fosfato dihidratado (DCPD) (S.-Y. Kim et al., 2017; Y.-K. Kim et al., 2011).

O colagénio é a proteína mais abundante existente na dentina, correspondendo a cerca de 90% da matriz orgânica. Este é sintetizado e subsequentemente controlado pelos odontoblastos. O principal tipo de colagénio presente é o I (mais de 85%), que forma um molde dinâmico para a deposição de cálcio e fosfato e sua consequente transformação em cristais de hidroxiapatite (Goldberg et al., 2011; Ravindran & George, 2015).

Outro tipo de proteínas, desta vez NCPs, como BMPs, fosfoproteínas, osteocalcina, proteoglicanos, osteonectina, e sialoproteínas na dentina está bem documentado (Khanijou et al., 2018; Tabatabaei et al., 2016).

As NCPs atuam como inibidores, promotores e/ou estabilizadores da deposição mineral, isto é, controlam o processo de mineralização das fibrilhas de colagénio e o crescimento de cristais de hidroxiapatite durante a formação de dentina (Neel et al., 2016; Tabatabaei et al., 2016).

Existem vários grupos de NCPs, sendo que um deles contém proteínas específicas para a dentina (DMPs), expresso exclusivamente pelos odontoblastos. Controlam importantes funções desde a fixação, proliferação e diferenciação das células estaminais e pré-osteoblastos, até à mineralização da matriz. Esse grupo de proteínas inclui DPP (fosfoproteínas da dentina), DSP (sialoproteínas da dentina) e DMP1 (proteínas da matriz dentinária 1) (Ravindran & George, 2015; Tabatabaei et al., 2016).

A DPP, também designada DMP 2, é a proteína não colagénica mais abundante da matriz dentinária, estando também presente na matriz óssea, embora numa

quantidade relativamente inferior. A presença da DPP em estádios tardios do desenvolvimento do osso alveolar sugere que esta proteína possa estar envolvida na regularização do tamanho dos cristais, bem como numa fase mais tardia da osteogênese (Ravindran & George, 2015).

As BMPs pertencem à família das TGF- $\beta$ , sendo as únicas moléculas sinalizadoras que conseguem induzir exclusivamente a formação de novo osso (Khanijou et al., 2018).

## 5.2. Dentina e osso alveolar

A dentina tornou-se num biomaterial de potencial interesse para a engenharia tecidual dos tecidos duros orais, dadas as suas propriedades osteoindutivas. A eficácia da dentina na regeneração do tecido ósseo tem despertado interesse. Os dentes e o tecido ósseo exibem uma composição química semelhante, incluindo principalmente os constituintes orgânicos e inorgânicos. O osso alveolar compreende uma percentagem de 65% de compostos inorgânicos e 35% orgânicos, em tudo semelhante à dentina (65-70% de compostos inorgânicos e 30-35% orgânicos) (Goldberg et al., 2011; Khanijou et al., 2018; Y.-K. Kim, 2012; Tabatabaei et al., 2016).

Outra notória propriedade dentinária é a presença de colagénio tipo I e tipo III e o número de fatores de crescimento, onde se incluem BMPs, IGF-2 (fator de crescimento “*insuline-like*” 2) e TGF- $\beta$ , que revelam um papel importante na remodelação óssea. Grande parte das proteínas presentes no tecido ósseo como a osteopontina, osteocalcina e sialoproteínas também se observam na dentina, tornado assim este material num viável substituto ósseo (Khanijou et al., 2018).

A matriz dentinária possui propriedades osteocondutivas e abundância em BMPs (Y.-K. Kim, 2012). Embora as BMPs derivadas da dentina humana sejam diferentes das BMPs do tecido ósseo, têm funções semelhantes no organismo (Um, Kim, & Mitsugi, 2017). Uma vez que as BMPs pertencem à linhagem das TGF- $\beta$ , sendo as únicas moléculas capazes de induzir a formação de novo osso, estas podem ser consideradas viáveis no processo de regeneração óssea (Khanijou et al., 2018).

As NCPs são um outro exemplo de proteínas comuns ao osso e à dentina. Embora as NCPs constituam apenas uma fração do volume dentinário e ósseo, sem estas proteínas seria impossível alcançar a formação e remodelação óssea. As DMPs,

osteocalcina, osteopontina e BSP (sialoproteínas ósseas) são alguns dos exemplos (Ravindran & George, 2015).

O osso é composto por um numeroso sistema de “*Havers*”, enquanto a dentina é formada por complexa estrutura tubulosa. (Khanijou et al., 2018).

### 5.3. Métodos de processamento da dentina

#### 5.3.1. Eliminação das proteínas não colagénicas

O método de processamento de dentina por extração das NCPs foi protocolado em 1979 por Smith et al. e nos dias de hoje, apesar das suas ténues alterações, ainda se considera adequado. O protocolo consiste na adição de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% ao particulado de dentina, cinco vezes por dia, durante dez dias, sendo posteriormente sujeito a um processo de centrifugação, para remoção do sobrenadante, diálise e liofilização, culminando com um material dentinário desprovido de NCPs (Tabatabaei et al., 2016).

Presentemente, na utilização deste protocolo, são utilizados outro tipo de ácidos, como hidróxido de cálcio e agregado trióxido mineral (MTA), no entanto o uso de EDTA apresenta melhores resultados na extração de NCPs (Tabatabaei et al., 2016).

#### 5.3.2. Desmineralização

O método de processamento de dentina por desmineralização foi primeiramente exposto por Reddi et al. em 1970, sendo o seu protocolo usado ainda nos dias de hoje, ressaltando algumas modificações (Tabatabaei et al., 2016).

E. Kim (2015) afirma que a dentina que não é submetida a um processo de desmineralização apresenta dificuldades na indução de novo osso, dada a quantidade elevada de componente mineral e cristalinidade, mas baixa porosidade, interferindo na migração, adesão e proliferação das células vasculares e mesenquimatosas.

Koga et al. (2016) reitera que, uma vez desmineralizada a dentina, ocorre uma abertura dos seus túbulos, que servem como canais de libertação de proteínas essenciais, como NCPs e BMPs, promovendo o crescimento e diferenciação dos osteoblastos (E. Kim, 2015).

Contudo, existem algumas limitações acerca deste processo, nomeadamente o tempo de preparação, que se revela longo (E. Kim, 2015).

Em 2008 foi desenvolvido um material de enxerto ósseo com recurso a dentes autógenos extraídos, pelo método de processamento por desmineralização, de patente coreana, denominado “Autogenous Tooth Bone Graft Material” (AutoBT<sup>®</sup>, Korea Tooth Bank, Seoul, Korea) (Y.-K. Kim, Lee, Kim, Um, & Murata, 2013).

#### 5.3.3. Eliminação da matriz orgânica

O método de processamento de dentina por eliminação da sua matriz orgânica tem sido referido num reduzido número de estudos, seguidamente relatados. Dada a significância das proteínas da matriz dentinária na migração, proliferação, adesão e diferenciação celulares, este método de processamento é evitado (Tabatabaei et al., 2016).

No estudo de Moharamzadeh, Freeman, & Blackwood (2008) foi demonstrada a distinta biocompatibilidade da dentina, de origem bovina, após desnaturação. O material foi fervido em água durante um período de duas horas, seguidamente colocado em isopropanol num período de igual duração e seco a uma temperatura de 100°C.

Elkayar, Elshazly, & Assaad (2009) fizeram, igualmente, uso de dentina de origem bovina, tendo sido fervida em água ao longo de noventa minutos, calcinada num ambiente húmido a 735°C e sintetizada a 1150°C, cujo produto final obtido foi hidroxiapatite.

#### 5.3.4. Dentina inalterada

Vários estudos apontavam o processo de limpeza, trituração, desmineralização e esterilização de dentes autógenos como um procedimento eficaz na regeneração de defeitos ósseos. No entanto, tal como referido anteriormente, só era possível obter este material várias horas ou dias após a extração. Desta forma, foi desenvolvido um novo método que visa a aplicação clínica de um particulado de dentina resultante da trituração de dentes recentemente extraídos, ou seja, num mesmo tempo de consulta, desprovido de bactérias (Binderman et al., 2014).

O dispositivo *Smart Dentin Grinder*<sup>®</sup>, desenvolvido pela Kometabio (USA), é indicado apenas para os dentes do próprio paciente, com o objetivo de triturar e seleccionar o dente extraído em partículas dentárias de um tamanho específico, por

forma a serem aplicadas como biomaterial de regeneração óssea (Binderman et al., 2017; Calvo-Guirado et al., 2018).

O processo de trituração e seleção de partículas específicas geralmente demora cerca de um minuto. A fase de trituração demora cerca de três segundos e a vibração para a seleção de partículas demora vinte segundos. Mais de 90% das partículas acumuladas na câmara contem entre os 300-1200  $\mu\text{m}$ , tamanho ideal para alcançar uma interação osteogénica no local da extração (Binderman et al., 2017).

O volume de particulado é cerca de duas a três vezes superior ao volume do dente. O critério de seleção das dimensões do particulado é baseado no facto de as partículas de tamanho inferior a 300  $\mu\text{m}$  facilitarem a rápida reabsorção óssea e sua manutenção, e as partículas de dimensão superior a 1200  $\mu\text{m}$  atuarem de forma inversa e reduzirem a reabsorção (Calvo-Guirado et al., 2018).

O particulado é emergido num produto químico de limpeza “*cleanser*” (0,5M de NaOH e 30% de álcool (v/v)), com recurso a um contentor esterilizado, durante quinze minutos, por forma a dissolver o biofilme de bactérias, toxinas e tecidos moles presentes na superfície dentária. O particulado é depois lavado com PBS (solução salina tampão), durante cinco minutos, e seco (Binderman et al., 2017; Calvo-Guirado et al., 2018).

O etanol a 70% desnatura e precipita as proteínas, atuando também como bactericida. A solução de desinfecção utilizada é composta por 30% de etanol a 70% que, adicionalmente à sua ação bactericida, intensifica a ação do NaOH (hidróxido de sódio), responsável pela eliminação das substâncias orgânicas que o etanol não é capaz de fazer. A combinação do etanol com o NaOH dissolve completamente as substâncias orgânicas e age como um eficiente desinfetante. O etanol afeta apenas os substratos orgânicos na superfície externa dos minerais, não afetando por isso as fibras de colagénio (Calvo-Guirado et al., 2018).

Binderman et al. (2014), no seu estudo, defende que o particulado de dentina autógena humana mineralizada deve ser considerado como o “*gold standard*” na preservação alveolar, bem como na regeneração de defeitos ósseos e nas abordagens de elevação do seio maxilar.

## 6. Evidência científica

Na elaboração do presente estudo piloto foi efetuada uma revisão literária sobre a aplicabilidade da dentina como biomaterial da regeneração óssea. A pesquisa bibliográfica tomou lugar nos repositórios digitais *B-On*, *Pubmed* e *Wiley Online Library*, através das palavras-chave “autogenous dentin graft”, “alveolar ridge preservation”, “autogenous tooth bone graft”, “dentin in tissue engineering”, “Smart Dentin Grinder” e “WDXRF”. Esta pesquisa inclui artigos redigidos na língua inglesa e publicados até ao ano de 2018.

Até ao momento, não existem meta-análises acerca do tema deste estudo piloto. No que diz respeito a revisões sistemáticas, verificam-se a existência de duas, de autoria de Tabatabaei et al. (2016) e Khanijou et al. (2018), que aferem os diversos métodos de processamento da dentina como biomaterial de regeneração óssea alveolar.

A tabela 3 enumera os estudos clínicos efetuados em humanos, que se encontram referidos nas revisões sistemáticas supracitadas.

Tabela 3 – Estudos clínicos efetuados em humanos com aplicação de dentina como biomaterial de regeneração (Khanijou et al., 2018; Tabatabaei et al., 2016)

Autor e data de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Murata M., 2003	Estudo de caso  N=1	Particulado de dentina autógena desmineralizada (DDM)	Seio maxilar (área relativa aos dentes 2.4 a 2.6)	5 meses após a intervenção, foi possível a colocar 3 implantes na zona intervencionada. A biópsia tecidular revelou a interação de tecido ósseo maduro com o DDM.



Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Gomes MF. et al., 2006	Estudo comparativo N=27	Matriz de dentina autógena desmineralizada (ADDM)	Processo alveolar de terceiros molares inferiores	A análise radiográfica do grupo ADDM + PTFE revelou uma homogênea radiopacidade óssea, quando comparada com o grupo de controlo e o grupo PTFE, durante todos os momentos de observação. A ADDM desvaneceu gradualmente do processo alveolar durante o processo de reparação.
Kim YK. et al., 2010	Série de casos N=6	Material de enxerto ósseo de dente autógeno (AutoBT)	Maxila= 5 Mandíbula= 1	O exame histológico da zona enxertada revelou uma reabsorção gradual do material de enxerto e substituição deste por novo osso, detetado em 46-87% da área de interesse.

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Kim YK. et al., 2011	Estudo de caso  N=2	Enxerto ósseo de dente autógeno sob a forma de pó ou em bloco	Preservação alveolar mandibular e maxilar, simultaneamente com a elevação do seio da última localização referida	Cicatrização adequada, possibilitando a colocação de implantes 3-3.5 meses após a intervenção cirúrgica.
Kim YK. & Choi YH., 2011	Estudo de caso  N=1	Enxerto ósseo de dente autógeno sob a forma de pó	Mandíbula	Aumento da estabilidade inicial. Ótima cicatrização regenerativa periodontal.
Kim YK. & Yi YJ., 2011	Estudo de caso  N=1	Enxerto ósseo de dente autógeno sob a forma de pó	Zona atrófica anterior da maxila	O material de enxerto ósseo, em combinação com a expansão da crista óssea alveolar, demonstrou uma cicatrização favorável.

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Lee, JY. & Kim YK., 2012	Estudo de cohort retrospectivo  N=54	Material de enxerto ósseo de dente autógeno (AutoBT)	Maxila  Mandíbula	A principal perda óssea marginal peri-implantar, observada 1 ano após a colocação de implantes, foi de $0,33 \pm 0,63$ mm.  Confirmou-se a seguridade do procedimento, que demonstrou resultados excelentes de regeneração durante 2 anos.
Park SM et al., 2012	Estudo comparativo  N=133	Material de enxerto ósseo de dente autógeno (AutoBT) sob a forma de pó, bloco e pó + bloco	Maxila  Mandíbula	A estabilidade inicial na colocação de implantes revelou uma média de 74 ISQ (quociente de estabilidade implantar), com a estabilidade secundária aumentada em 84 ISQ.  O valor médio de perda óssea a nível mandibular, medido 6 meses após a carga protética foi de 0,29 mm, variando entre os 0 e os 3 mm.

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Kim YK. et al., 2013	Estudo de caso  N=12	Material de enxerto ósseo de dente autógeno (AutoBT) sob a forma de bloco	Defeitos peri- -implantares da região mandibular	Em todos os pacientes foi possível observar uma boa cicatrização óssea. Em apenas um dos casos não se verificou a osteointegração do implante.
Kabir MA et al., 2014	Estudo de caso  N=2	Matriz de dentina desmineralizada (DDM)	Região anterior da maxila  Região dos terceiros molares mandibulares	Região anterior da maxila: as radiografias pós-operatórias revelam uma excelente cicatrização óssea por ação da DDM, após 1 ano.  Região dos terceiros molares mandibulares: as radiografias pós-operatórias demonstram a formação de novo osso, revelando uma completa cicatrização do alvéolo.

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Gideon H. & Binderman I., 2014	Série de casos  N>100	Particulado de dentina autógeno	Maxila  Mandíbula	<p>48 dos alvéolos intervencionados e preenchidos com o material de regeneração proveniente de dentina autógena revelaram a formação de novo osso, 4 meses após a intervenção.</p> <p>Não se observou perda óssea em redor do implante após colocação do particulado de dentina autógeno.</p> <p>2 meses pós a intervenção do seio maxilar observou-se uma cicatrização adequada, o que tornou possível a colocação de implantes de carga imediata 1 mês depois dessa observação.</p>

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Pohl V. et al., 2016	Estudo de caso  N=6	Particulado dentário	Maxila	<p>Normal cicatrização pós-operatória.</p> <p>5 anos após a intervenção, a profundidade de sondagem peri-implantar média foi de 1,86 mm na região mesio-lingual e 2,07 mm na zona disto-vestibular.</p> <p>A reabsorção óssea peri-implantar, no primeiro ano após a intervenção foi, em média, 0,63mm, com valores mínimos verificados de 0 mm e máximos de 2,9 mm.</p> <p>A avaliação histológica demonstrou osteogenicidade e osteocondutividade, com encapsulação do esmalte e dentina e reabsorção parcial do particulado dentário.</p> <p>A análise imuno-histoquímica demonstrou a formação de novos vasos na área enxertada.</p>

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Kim, YK. et al., 2016	Estudo prospetivo longitudinal  N=5	Matriz de dentina desmineralizada	Maxila  Mandíbula	<p>Todos os casos demonstraram uma completa formação óssea no follow-up final (5 anos e 5.8 meses após a intervenção cirúrgica).</p> <p>Verificou-se uma diminuição da altura óssea vestibular (entre - 0.4 mm e - 3.3mm) bem como da sua largura (entre - 0.4mm e - 4.2 mm).</p> <p>Em suma, as alterações ósseas variaram entre - 8.1% e - 36.2%.</p>

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Joshi CP et al., 2016	Ensaio clínico randomizado e controlado  N=45	Particulado dentário autógeno (ATG)	Maxila =18  Mandíbula =12	Existem diferenças estatisticamente significativas na altura e largura da crista alveolar no que diz respeito aos três grupos de estudo. De entre os três grupos estudados, os locais que receberam o ATG demonstraram melhores resultados.  A análise histológica demonstrou, também, a mesma tendência de resultados, com formação de novo osso nas zonas enxertadas com ATG.



Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Kim YK et al., 2017	Série de casos  N=22	Matriz de dentina desmineralizada em bloco (ABTB)	Maxila =12  Mandíbula =10	Observou-se uma incorporação e remodelação do ABTB em osso cortico-esponjoso. A forma e o volume foram mantidos, verificando-se apenas um pequeno volume de perda óssea marginal.
Joshi CP et al., 2017	Ensaio clínico randomizado e controlado  N=60	Particulado dentário alógeno	Maxila =26  Mandíbula =19	Comparando com outras localizações (de controlo e de aplicação de FDBA – particulado alógeno de osso liofilizado), a aplicação de WTA (aloenxerto correspondente à totalidade do dente) e DA (aloenxerto de dentina) apresentam melhores resultados. A análise histológica verificou formação de novo osso nas zonas de utilização de WTA e DA.

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Kim YK et al., 2017	Estudo clínico retrospectivo  N=18	Matriz de dentina alógena desmineralizada (DDM)	Maxila =10  Mandíbula =8	Não foram observadas complicações. Decorreu encapsulação das partículas de DDM, parâmetro passível de avaliar a biocompatibilidade. Remodelação completa, com formação de novo tecido ósseo.

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Pang KM et al., 2017	Ensaio clínico randomizado e controlado  N=33	Material de enxerto ósseo de dente autógeno (AutoBT)	Maxila =21  Mandíbula =12	<p>Ambos os grupos (AutoBT e Bio-Oss®) demonstraram uma cicatrização favorável, semelhante estabilidade implantar e confirmação histológica de nova formação óssea.</p> <p>Em termos histomorfométricos, a formação de novo osso foi de <math>31,24 \pm 13,87\%</math> no caso dos alvéolos enxertados com AutoBT, ao passo que a utilização de Bio-Oss® apresentou valores de <math>35,00 \pm 19,33\%</math>.</p> <p>O ISQ dos implantes colocados nos alvéolos onde foi utilizado AutoBT foi de <math>72,80 \pm 10,81</math> e de <math>70,0 \pm 12,86</math> onde se utilizou Bio-Oss®.</p>

Autor e ano de publicação	Nível de evidência e tamanho da amostra	Tipo de enxerto	Local de aplicação	Resultado
Minamizato T. et al., 2018	Estudo piloto N=16	Matriz de dentina autógena parcialmente desmineralizada (APDDM)	Maxila =9  Mandíbula =7	A preservação alveolar com material de enxerto foi praticado em 7 pacientes, com colocação de implante 4-6 meses após, não se verificando a perda dos mesmos no <i>follow-up</i> de 24 meses. A cirurgia de elevação do seio maxilar foi efetuada em 3 pacientes, cujas imagens da tomografia computadorizada (TC) revelam aumento e remodelação óssea. Em relação à colocação de implantes com utilização simultânea de APDDM, os resultados revelaram a substituição do material de enxerto por tecido ósseo imaturo, 3 meses após a cirurgia, sem perda do implante aos 24 meses de <i>follow-up</i> .

A partir dos estudos clínicos referidos na tabela 3, podemos inferir que, entre si, conclusões semelhantes ou seja, evidenciam a biocompatibilidade dos materiais de enxerto de origem dentinária, com recuperações pós-operatórias favoráveis e sinais osteoindutivos, osteocondutivos e osteogénicos. No que diz respeito à taxa de sobrevivência implantar, mais propriamente sobre os implantes colocados após a regeneração alveolar com biomaterial de enxerto dentinários, não existem referências a casos de insucesso.



## II. OBJETIVOS

### 1. Objetivos do estudo

Este trabalho de investigação laboratorial trata-se de um estudo piloto *in vitro*, no qual se pretende avaliar um particulado de dentina autógena humana mineralizada no que se refere:

- a) Análise da eficácia da aplicação da solução básica alcoólica na eliminação bacteriana;
- b) Análise da composição inorgânica após obtenção do particulado de dentina autógena mineralizada de várias partes do dente (coroa, raiz e dente completo).

### 2. Hipóteses de estudo

#### 2.1. Primeira fase de estudo

Hipótese 1 (H1) – A aplicação da solução básica alcoólica é eficaz na eliminação bacteriana.

#### 2.2. Segunda fase de estudo

Hipótese 2 (H2) – O rácio cálcio/fósforo, contabilizado com recurso ao sistema espectrómetro de fluorescência de raios x por dispersão em comprimento de onda, contido no particulado de dentina autógena humana mineralizada de diferentes zonas do dente, apresenta diferenças estatisticamente significativas.





### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Tipo de estudo

Estudo de investigação piloto *in vitro*.

#### 2. Local de realização do estudo

Este trabalho de investigação piloto *in vitro* foi realizado nos laboratórios do Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz (CiEM).

#### 3. Amostra

A amostra é constituída por 16 particulados, obtidos a partir da trituração de 16 dentes íntegros extraídos, por motivos periodontais, ortodônticos, terceiros molares e dentes total ou parcialmente impactados, excluindo-se dentes endodonciados, na Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM), com recurso à máquina “*Smart Dentin Grinder*®”.

#### 4. Materiais

- 16 dentes autólogos
- Brocas de carbide de tungsténio
- “*Smart Dentin Grinder*®” (Kometabio, USA)
- Cápsulas de trituração esterilizadas
- Frascos de análise esterilizados de 60 ml
- Cureta cirúrgica
- Pipeta graduada 10 ml
- Solução salina tampão fosfatada estéril (PBS)
- Meios de cultura gelose sangue
- Zaragatoa esterilizada
- Solução básica alcoólica composta por 0,5M de NaOH e 30% de álcool (v/v) (“*cleanser*”)
- Pipeta plástica esterilizada
- WDXRF (modela S4 Pionner, marca Bruker)
- Copos de amostra de polietileno, de diâmetro 35,8mm

- Películas de filme Prolene 4 µm

## 5. Grupos de estudo

Para análise da eficácia da solução básica alcoólica foi utilizado o particulado obtido através da trituração de um dente molar (N=1).

Para a análise da composição inorgânica, foi utilizado o particulado obtido através da trituração de 15 dentes, definidos três grupos de estudo: grupo A (coroa triturada), grupo B (raiz triturada) e grupo C (dente completo triturado). Cada grupo foi ainda segmentado em cinco subgrupos, por forma a abranger os cinco tipos de dentes - incisivos centrais, incisivos laterais, caninos, pré-molares e molares - tal como se representa na tabela seguinte (ver tabela 4):

Tabela 4 – Grupos de estudo.

Grupo A – coroa N=5		Grupo B – raiz N=5		Grupo C – dente completo N=5	
A1 – coroa IC	N=1	B1 – raiz IC	N=1	C1 - IC	N=1
A2 – coroa IL	N=1	B2 – raiz IL	N=1	C2 – IL	N=1
A3 – coroa C	N=1	B3 – raiz C	N=1	C3 – C	N=1
A4 – coroa PM	N=1	B4 – raiz PM	N=1	C4 – PM	N=1
A5 – coroa M	N=1	B5 – raiz M	N=1	C5 – M	N=1

IC: incisivo central; IL: incisivo lateral; C: canino; PM: pré-molar; M: molar

## 6. Protocolo experimental

### Preparação dos dentes autólogos extraídos

1. Remoção dos tecidos periodontais relacionados com os dentes extraídos, com recurso a brocas de carbide de tungsténio (ver figura 1).



Figura 1 – Remoção dos tecidos periodontais com recurso a broca de carbide de tungsténio.

2. Secagem dos dentes com seringa de ar.

Preparação do dispositivo “*Smart Dentin Grinder*®” (Kometabio, USA)

1. Inserir a câmara de trituração esterilizada no aparelho.
2. Alinhar a seta da câmara de trituração “LOCK” com a mesma seta que consta no equipamento, rodando-a para a direita, por forma a travá-la na posição.
3. Ligar o equipamento (ver figura 2).



Figura 2 – Equipamento “*Smart Dentin Grinder*®”.

Trituração do(s) dente(s)

1. Colocar o(s) dente(s) na câmara de trituração, previamente seco(s) com seringa de ar (ver figura 3).



Figura 3 – Dente na câmara de trituração da “*Smart Dentin Grinder*®”.

2. Colocar a tampa transparente na câmara e rodar no sentido contrário ao dos ponteiros do relógio, travando-a na posição.

3. Pressionar o botão “GRIND”, definindo o tempo de trituração (3 segundos) através dos botões “UP” e/ou “DOWN”.
4. Pressionar o botão “SORT”, definindo o tempo de trituração (20 segundos) através dos botões “UP” e/ou “DOWN”.
5. Pressionar o botão “START”, dando início à trituração.
6. Repetir o procedimento, caso seja necessário completar a trituração.

#### Recolha do particulado

1. As partículas de tamanho compreendido entre 300 a 1 200  $\mu\text{m}$ , resultantes deste processo, são depositadas no compartimento superior do equipamento. No compartimento inferior depositam-se as partículas de tamanho inferior a 300  $\mu\text{m}$  (ver figura 4).



Figura 4 – Compartimentos inferior (à esquerda) e superior (à direita) do equipamento “Smart Dentin Grinder®”.

2. Armazenamento do particulado de acordo com os grupos de estudo definidos (ver figura 5).

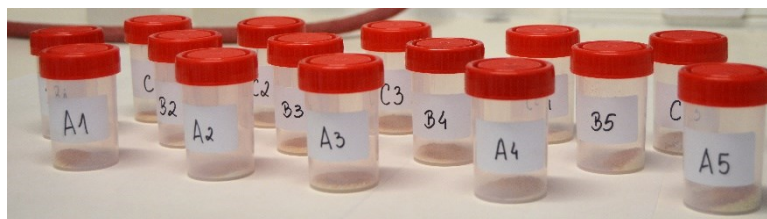


Figura 5 – Particulado de dentina autógena mineralizada, nos respectivos frascos, de acordo com os grupos estipulados para este trabalho de investigação.

#### Diluição do particulado – até um máximo de 250 colónias

1. Diluição de 0,5 g de particulado em 4,5 ml de solução salina tampão fosfatada estéril (PBS), numa proporção de 1:9, no sentido de manter o fator de diluição  $10^{-1}$ .
2. Pipetar 0,1 ml da solução 1., adicionado a 9 ml de solução salina tampão fosfatada estéril (PBS), no sentido de manter o fator de diluição de  $10^{-2}$ .
3. Pipetar 0,1 ml da solução 2., adicionado a 9 ml de solução salina tampão fosfatada estéril (PBS), no sentido de manter o fator de diluição de  $10^{-3}$ .

#### Incubação da solução

1. Incubar a solução de fator de diluição  $10^{-3}$  num meio de cultura de gelose sangue, a 35°C, durante 24/48 horas, recorrendo a zaragatoa esterilizada.

#### Teste à eficácia da solução de desinfeção

1. Cobrir toda a área do meio de cultura com a solução básica alcoólica “*cleanser*”, com recurso a pipeta plástica esterilizada, analisando os resultados de acordo com os períodos de tempo protocolados:
  - Antes da colocação da solução básica alcoólica;
  - Imediatamente após a colocação da solução básica alcoólica (0 minutos);
  - 3 minutos após a colocação da solução básica alcoólica;
  - 10 minutos após a colocação da solução básica alcoólica.

#### Determinação da composição inorgânica das amostras de dentina autógena mineralizada

1. Preparação dos copos de amostra de polietileno, de 34,8 mm, com película de filme Prolene de 4mm, capaz de suportar as amostras, distribuindo a amostra de forma uniforme pelo diâmetro do copo.
2. Encerrar os copos com a tampa apropriada.
3. Colocação dos copos em porta-amostras de aço, de diâmetro de abertura de 34 mm (figura 6).



Figura 6 – Copo de amostra de polietileno, devidamente preparados com a película de filme capaz de suportar as amostras, devidamente encerrado e posicionado.

4. Disposição dos porta-amostras no tabuleiro do aparelho WDXRF (Modelo S4 Pionner, da marca Bruker), de forma ordenada (figuras 7 e 8).



Figura 7 – Aparelho WDXRF (Modelo S4 Pionner, da marca Bruker).

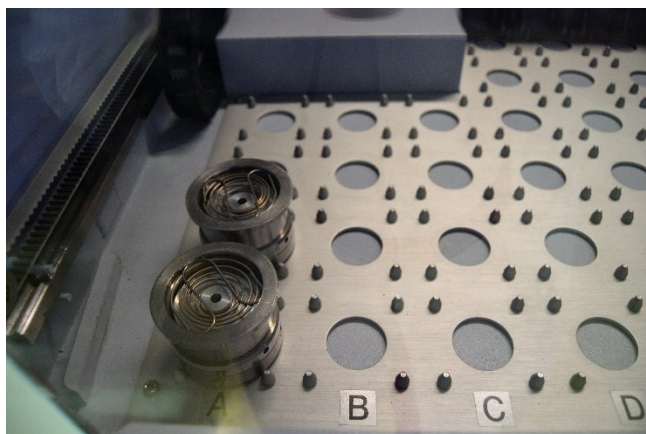


Figura 8 – Porta-amstras dispostos no tabuleiro do aparelho WDXRF.

5. Controlada através de um programa informático, a máquina faz a recolha dos porta-amstras pretendidos, colocando-os na câmara de análise (ver figura 9), onde se faz incidir o feixe de raios x. Esta informação é processada, obtendo-se as concentrações elementares presentes nas amostras, registadas em partes por milhão (ppm). É também possível analisar o espectro de emissão dos elementos presentes em cada uma das amostras.

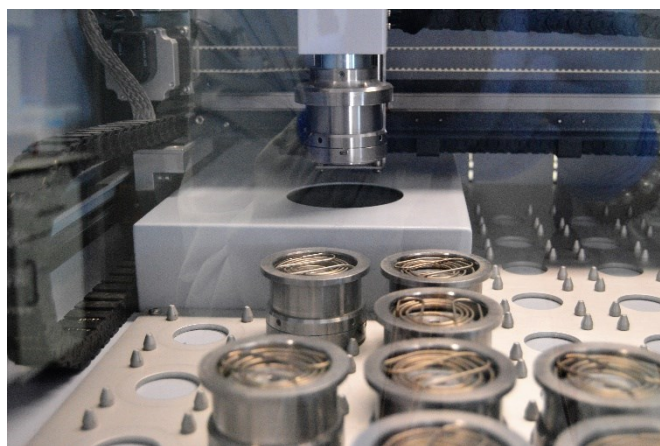


Figura 9 – Porta-amstras transportados até à câmara de análise.





#### IV. RESULTADOS

##### 1. Determinação da eficácia da solução básica alcoólica na eliminação bacteriana

Após diluição do particulado até um máximo de 250 colónias, e sua posterior incubação num meio de cultura de gelose sangue num período de 48 horas, é possível observar, através da figura 10, que houve crescimento bacteriano, considerando a presença de colónias maioritariamente na forma de pontos e na forma circular, de coloração cinzenta.



Figura 10 – Meio de cultura de gelose sangue após 48 horas de incubação.

A eficácia da solução de desinfecção foi testada de acordo com os períodos de tempo protocolados, isto é, imediatamente após a colocação da solução de desinfecção (A), 3 minutos após (B) e 10 minutos após (C) (ver figura 11).



(A)



(B)



(C)

Figura 11 – Ação da solução de desinfecção imediatamente após a colocação da mesma (A), 3 minutos após (B) e 10 minutos após (C).

Na figura 11(A), captada imediatamente após a utilização da solução de desinfecção, ainda é possível observar-se a presença de colônias sob a forma de pontos e na forma circular, de cor cinzenta, no entanto a coloração é mais desvanecida. As figuras 11(B) e 11(C), apesar de terem sido captadas em momentos diferentes, aos 3 e 10 minutos após utilização da solução de desinfecção, respectivamente, apresentam resultados semelhantes, com uma descoloração quase total das colônias que se desenvolveram após incubação em meio de cultura de gelose sangue por 48 horas, o que significa que a atividade bacteriana foi inibida.

Afirma-se, assim, a primeira hipótese de estudo (H1) – **a aplicação da solução básica alcoólica é eficaz na eliminação bacteriana** - constatando-se que existe eficácia na eliminação bacteriana quando aplicada a solução básica alcoólica (“*cleanser*”), observável através da destruição e inibição dos microrganismos existentes, desde os períodos de tempo primários protocolados.

## **2. Determinação da composição elementar das amostras analisadas**

Foram analisadas as composições elementares das amostras que constituem os três grupos em estudo e seus subgrupos. Constam, na tabela 5, em partes por milhão (ppm) e percentagem (%) com duas casas decimais, a massa dos elementos cálcio e fósforo, relativamente à massa da amostra de cada um dos subgrupos analisados, obtidos após análise através do sistema espectrómetro de fluorescência de raios x por dispersão em comprimento de onda.

Tabela 5 – Massa dos elementos cálcio e fósforo, relativamente à massa da amostra, em ppm e percentagem, de cada um dos subgrupos, obtidos após análise pelo sistema espectrómetro de raios x por dispersão em comprimento de onda.

Grupos	Subgrupos		Cálcio (ppm)	Cálcio (%)	Fósforo (ppm)	Fósforo (%)
<b>A</b>	A1	N=1	211110,5	21,11	100330,0	10,03
	A2	N=1	230206,1	23,02	107306,8	10,73
	A3	N=1	235514,0	23,55	110314,3	11,03
	A4	N=1	225492,1	22,55	104747,3	10,47
	A5	N=1	216071,1	21,61	97625,5	9,76
<b>B</b>	B1	N=1	213696,8	21,37	97595,6	9,76
	B2	N=1	224418,8	22,44	103200,9	10,32
	B3	N=1	206263,7	20,63	88643,6	8,86
	B4	N=1	197478,2	19,75	86470,8	8,65
	B5	N=1	186686,3	18,67	79186,0	7,92
<b>C</b>	C1	N=1	187899,3	18,79	83259,7	8,33
	C2	N=1	209322,7	20,93	95728,0	9,57
	C3	N=1	210869,1	21,09	93363,2	9,34
	C4	N=1	194916,3	19,50	88775,5	8,88
	C5	N=1	226664,2	22,67	99173,8	9,92

Os valores registados na tabela 5 foram obtidos após análise pelo sistema espectrómetro de raios x por dispersão em comprimentos de onda. Os porta-amostras, que contêm as amostras a ser analisadas, são unitária e ordenadamente selecionados pelo aparelho que, na sua câmara de análise, faz incidir um feixe de raios x sobre esse objeto. A informação obtida é processada através de um programa informático, sendo assim possível obter a massa dos elementos cálcio e fósforo, relativamente à massa da amostra, existente em cada uma dessas. É também possível obter o espectro de emissão dos elementos presentes em cada uma das amostras, como exemplifica a figura 12, que diz respeito ao espectro de emissão relativo aos elementos cálcio e fósforo presentes nas amostras A1 (coroa triturada de incisivo central) e B1 (raiz triturada de incisivo lateral).

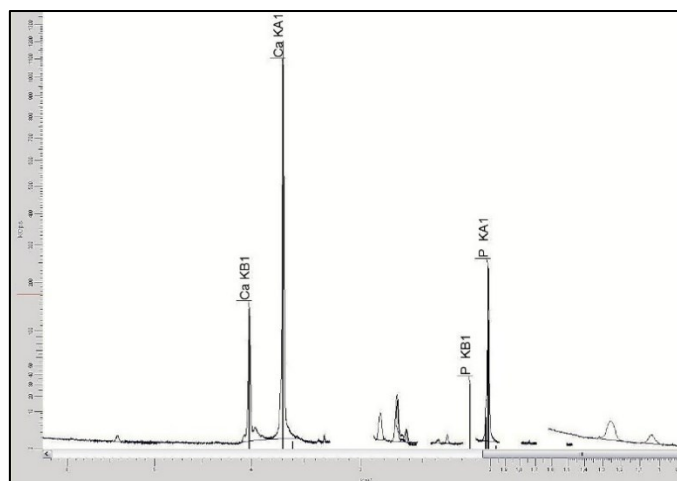


Figura 12 - Espectro de emissão relativo aos elementos cálcio e fósforo, presentes nas amostras A1 e B1.

Através da fórmula

$$\text{Rácio Ca/P} = \text{Cálcio (\%)} / \text{Fósforo (\%)}$$

foi possível calcular o rácio cálcio/fósforo (Ca/P), com duas casas decimais (ver tabela 6), presente em cada um dos subgrupos.

Tabela 6 – Rácio de cálcio/fósforo em cada um dos subgrupos.

Grupos	Subgrupos		Ca/P
<b>A</b> N=5	A1	N=1	2,10
	A2	N=1	2,15
	A3	N=1	2,13
	A4	N=1	2,15
	A5	N=1	2,21
<b>B</b> N=5	B1	N=1	2,19
	B2	N=1	2,17
	B3	N=1	2,33
	B4	N=1	2,28
	B5	N=1	2,36
<b>C</b> N=5	C1	N=1	2,26
	C2	N=1	2,19
	C3	N=1	2,26
	C4	N=1	2,20
	C5	N=1	2,29

Para o cálculo dos valores registados na tabela 6, através da fórmula anteriormente referida, foram utilizados os valores, em partes por milhão (ppm), da massa dos elementos cálcio e fósforo, relativamente à massa da amostra existente, obtidos pela incidência de um feixe de raios x nas amostras contidas em cada um dos porta-amostras, pelo sistema espectrómetro de raios x por dispersão em comprimento de onda.

### **3. Metodologia de análise estatística**

A análise estatística foi executada com recurso ao sistema operacional IBM SPSS, na versão 24.0, do ano de 2016 (IBM Corporation, New York, USA).

A consideração simultânea das três variáveis até aqui referidas (percentagem de cálcio, percentagem de fósforo e rácio cálcio/fósforo), para efeitos de análise estatística, inflacionariam o nível de significância da análise que se pretende efetuar com este estudo piloto, resultando em conclusões cuja validade não seria estatisticamente sustentada. Desta forma, tendo em conta a correlação entre as variáveis acima referidas, por razões quantitativas relativas ao tamanho da amostra, e argumentos de natureza fisiológica que dão relevo à razão cálcio/fósforo, este será o único parâmetro analisado por meio de testes estatísticos.

Realizou-se uma análise estatística descritiva, relativa aos valores percentuais dos elementos cálcio e fósforo, tendo-se obtido os valores de média, desvio padrão, erro padrão, intervalo de confiança de 95% relativamente à média, com limites inferior e superior, mínimos e máximos.

Relativamente à análise estatística do rácio cálcio/fósforo, e tendo em conta o design experimental, as características das variáveis avaliadas e a dimensão dos grupos, entre outros fatores, seguiu-se uma abordagem com a utilização dos testes de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn com correção de Bonferroni. O nível de significância utilizado foi de 5%.

### **4. Caracterização estatística da amostra**

Este estudo piloto tem como objetivo verificar se existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao rácio cálcio/fósforo. Uma vez que os valores calculados e/ou obtidos, dentro de cada um dos grupos, se apresentam

semelhantes, avançou-se para a possibilidade de realização do estudo estatístico entre grupos (A – coroa triturada, B – raiz triturada e C – dente completo triturado).

Na tabela 7 constam os resultados obtidos após análise estatística descritiva das percentagens de cálcio e fósforo, obtidos de acordo com os grupos estudados (A – coroa triturada, B – raiz triturada e C – dente completo triturado).

Tabela 7 – Estatística descritiva das percentagens de cálcio e fósforo segundo os grupos estudados.

	Grupos	N	Média	DP	EP	IC 95% média		Min	Max
						Lim sup.	Lim inf.		
<b>Cálcio (%)</b>	Total	15	21,1787	1,51576	0,39137	20,3393	22,0181	18,67	23,55
	A	5	22,3680	1,00156	0,44791	21,1244	23,6116	21,11	23,55
	B	5	20,5720	1,45111	0,64896	18,7702	22,3738	18,67	22,44
	C	5	20,5960	1,50996	0,67527	18,7211	22,4709	18,79	22,67
<b>Fósforo (%)</b>	Total	15	9,5713	0,90220	0,23295	10,0710	9,0717	7,92	11,03
	A	5	10,4040	0,51408	0,22990	11,0423	9,7657	9,76	11,03
	B	5	9,1020	0,94558	0,42288	10,2761	7,9279	7,92	10,32
	C	5	9,2080	0,61925	0,27694	9,9769	8,4391	8,33	9,92

DP: desvio padrão; EP: erro padrão; IC 95% média: intervalo de confiança de 95% relativamente à média; Lim sup: limite superior; Lim inf: limite inferior; Min: mínimo; Max: máximo

A figura 13 ilustra, por meio de um gráfico de barras, os valores médios dos grupos A, B e C relativamente à percentagem de cálcio.

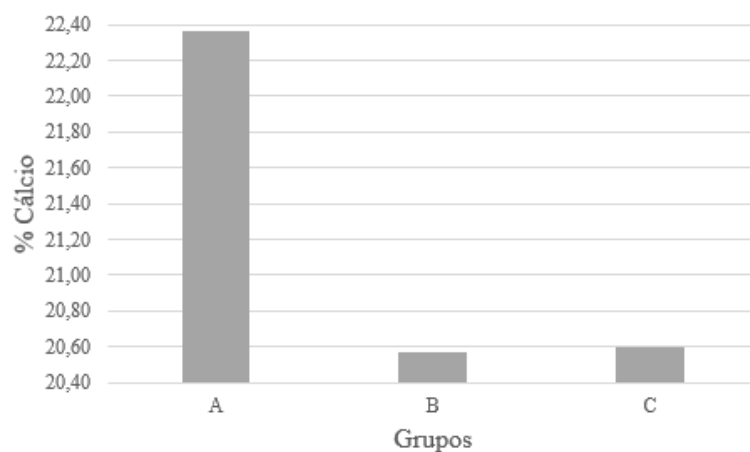


Figura 13 – Gráfico de valores médios dos grupos A, B e C relativamente à percentagem de cálcio.

A figura 14 ilustra, por meio de um gráfico de barras, os valores médios dos grupos A, B e C relativamente à percentagem de fósforo.

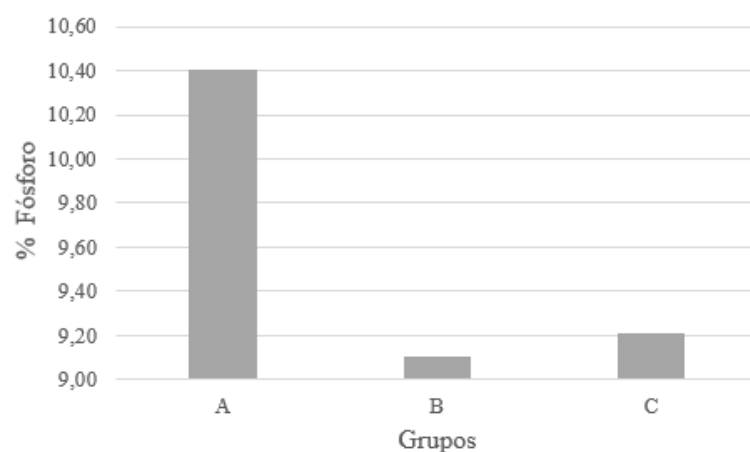


Figura 14 – Gráfico de valores médios dos grupos A, B e C relativamente à percentagem de fósforo.

Na tabela 8 constam os resultados obtidos após análise estatística descritiva do rácio cálcio/fósforo, obtido de acordo com os grupos estudados (A – coroa triturada, B – raiz triturada e C – dente completo triturado).

Tabela 8 - Teste Kruskal-Wallis para identificação de diferenças estatísticas entre grupos, relativamente ao rácio cálcio/fósforo.

	Grupos	N	Média	Mediana	DP	IC 95% média		Amplitude interquartil
						Lim sup.	Lim inf.	
<b>Rácio Ca/P</b>	A	5	2,1506	2,1454	0,01792	2,2004	2,1009	0,06
	B	5	2,2666	<b>2,2832</b>	0,03658	2,3692	2,1650	0,16
	C	5	2,2364	2,2557	0,01911	2,2895	2,1833	0,10

DP: desvio padrão; IC 95% média: intervalo de confiança de 95% relativamente à média; Lim sup: limite superior; Lim inf: limite inferior

A partir da tabela 8, podemos inferir a variação dos valores medianos relativamente ao rácio cálcio/fósforo.

Referente ao rácio cálcio/fósforo, o valor mediano do grupo B (raiz triturada) é igual a 2,2832, sendo por sua vez superior ao dos grupos A (coroa triturada) e C (dente completo triturado), de valores medianos 2,1454 e 2,2557, respetivamente (ver figura 15).

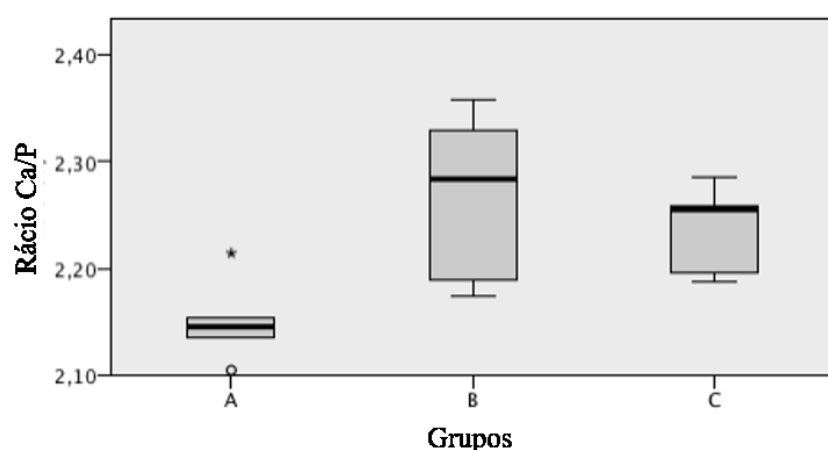


Figura 15 – Diagramas de extremos e quartis referentes aos valores do rácio Ca/P.



Em termos estatísticos, e de acordo com os resultados do teste de Kruskal-Wallis são identificadas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao rácio cálcio/fósforo ( $p=0,034$ ).

Através do teste de Dunn com correção de Bonferroni, é possível verificar que a diferença estatística reside entre os grupos A (coroa triturada) e B (raiz triturada), de  $p=0,049$ . A comparação entre os grupos A (coroa triturada) e C (dente completo triturado), de  $p=0,121$ , e entre os grupos B (raiz triturada) e C (dente completo triturado), de  $p=1,000$ , não revelam diferenças significativas (ver tabela 9).

Tabela 9 – Teste de Dunn com correção de Bonferroni para identificação de diferenças estatísticas entre grupos, relativamente ao rácio cálcio/fósforo

	Grupo	Grupo de comparação	p*
Rácio cálcio/fósforo	A	B	<b>0,049</b>
	B	C	1,000
	C	A	0,121

\* valor indicador da presença de diferenças estatísticas significativas entre grupos.

Nível de significância: 0,05

Desta forma, relativamente à segunda hipótese de estudo (H2) – **o rácio cálcio/fósforo, contabilizado com recurso ao sistema espectrómetro de fluorescência de raios x por dispersão em comprimento de onda, contido no particulado de dentina autógena humana mineralizada de diferentes zonas do dente, apresenta diferenças estatisticamente significativas** – constata-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,034$ ) em relação ao rácio cálcio/fósforo nos grupos estudados, isto é, coroa triturada (grupo A), raiz triturada (grupo B) e dente completo triturado (grupo C). Essa diferença reside entre os grupos A (coroa triturada) e B (dente completo triturado) ( $p=0,049$ ).



## V. DISCUSSÃO

### 1. Relevância do tema estudado

As extrações dentárias são um dos procedimentos médico-dentários mais comuns, amplamente documentado, podendo induzir alterações significativas nas dimensões da crista óssea alveolar (Binderman, Hallel, Nardy, Yaffe, & Sapoznikov, 2015).

Relativamente à reconstrução dos defeitos dos tecidos duros, vários estudos afirmam que o material de enxerto de osso autógeno é o material ideal na regeneração óssea, também designado de “*gold standard*”. A vantagem de utilização deste inclui o aumento da capacidade de formação óssea, osteocondução e osteoindução, de rápidos resultados cicatriciais, não induzindo rejeição imunológica. Porém, a quantidade limitada de material possível de obter, assim como os defeitos secundários na área dadora revelaram-se as principais desvantagens (Y.-K. Kim, Kim, Bae, et al., 2014; Y.-K. Kim, Kim, Yun, et al., 2014; Y.-K. Kim, Lee, Yun, Yun, & Um, 2014).

Como alternativa, foram desenvolvidos outros tipos de substitutos ósseos, entre eles aloenxertos, xenoenxertos e materiais aloplástico que, em termos regenerativos, apresentam resultados ínferos ao material de enxerto de osso autólogo (Y.-K. Kim, 2012; Y.-K. Kim, Kim, Bae, et al., 2014).

Os dentes extraídos são geralmente consideradas um biomaterial supérfluo e desta forma a sua aplicabilidade clínica como material cirúrgico para a regeneração do osso alveolar após a(s) extração(ões) é vantajoso, inclusivamente em termos económicos (Rijal & Shin, 2017).

A matriz dentinária é considerada uma alternativa apropriada aos materiais de enxerto ósseo, na reconstrução e regeneração dos defeitos maxilo-faciais, dada a possibilidade de libertação de proteínas insolúveis bioativas como as BMPs bem como de células de suporte, que facilitam o processo osteogénico (Rijal & Shin, 2017; Tabatabaei et al., 2016).

Desta forma, quando as extrações dentárias são necessárias, os materiais de enxerto derivados do material dentário podem ser considerados como uma opção viável, graças à sua origem autógena e resultados clínicos e histológicos favoráveis (Y.-K. Kim, Lee, Um, et al., 2013).

A “*Smart Dentin Grinder*®” torna possível a preparação de um particulado de dentina mineralizada, livre de bactérias, a partir de dentes recentemente extraídos, que pode ser utilizado como material de regeneração óssea no mesmo tempo de consulta (Calvo-Guirado et al., 2017).

O particulado de dentina mineralizada tem a vantagem de conseguir manter a estabilidade mecânica, tornando também possível a carga imediata com implantes. Embora as propriedades indutivas sejam mais tardiamente colocadas em prática, a dentina mineralizada é firmemente integrada na formação de novo osso (Calvo-Guirado et al., 2017; Y.-K. Kim, 2012).

## 2. Análise do estudo executado

O objetivo principal deste estudo vincula a caracterização da composição inorgânica de um particulado de dentina autógena humana mineralizada, com recurso ao sistema espectrómetro de fluorescência de raios x por dispersão em comprimento de onda, tendo-se obtido o particulado através do aparelho “*Smart Dentin Grinder*®”. Foi igualmente objetivada a análise da eficácia da solução básica alcoólica (“*cleanser*”) na eliminação bacteriana.

A análise da solução básica alcoólica, respeitando os tempos protocolados, demonstrou ser eficaz na eliminação da totalidade ou quase totalidade dos microrganismos presentes, uma vez que, tal como relatado por Binderman et al. (2017), pode dar-se a possibilidade de algumas bactérias sobreviverem a este tipo de processo de desinfecção, uma vez que algumas delas vivem em harmonia com o hospedeiro.

De forma a analisar a composição inorgânica da totalidade do dente, apenas da coroa e só da raiz, executou-se uma análise da composição elementar de cálcio e fósforo, presentes em cada uma das quinze amostras analisadas, através do sistema de fluorescência de raios x por dispersão em comprimento de onda. A partir dos valores obtidos foi possível calcular o rácio cálcio/fósforo referente a cada uma das amostras.

A consideração simultânea das variáveis cálcio, fósforo e rácio cálcio/fósforo, para efeitos de análise estatística, inflacionariam o nível de significância da análise que se pretendia efetuar com este estudo piloto, resultando em conclusões cuja validade não seria estatisticamente sustentada. Desta forma, tendo em conta a correlação entre as três variáveis atrás referidas, por razões quantitativas relativas ao tamanho da amostra, e

argumentos de natureza fisiológica que dão relevo à razão cálcio/fósforo, este foi o único parâmetro analisado por meio de testes estatísticos.

Desta forma, no que respeita ao rácio cálcio/fósforo, o valor mediano do grupo B (2,2832), que diz respeito à raiz triturada, é superior ao dos grupos A (coroa triturada) e C (dente completo triturado), de valores medianos 2,1454 e 2,2557, respetivamente. Aqui considera-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,034$ ) de entre grupos estudados, isto é, coroa triturada (grupo A), raiz triturada (grupo B) e dente completo triturado (grupo C), sendo que essa diferença reside entre os grupos A (coroa triturada) e B (raiz triturada) ( $p=0,049$ ).

O mineral que se apresenta em maior abundância no dente humano é a hidroxiapatite (HA)  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . O esmalte e a dentina são predominantemente compostos por este mineral, apresentando-se numa percentagem de 97% a nível do primeiro e 70% ao nível do segundo (Teruel et al., 2015).

Y.-K. Kim, Kim, Yun, et al. (2014) refere as afirmações de numerosos autores acerca da solubilidade da HA, que reportam elevada solubilidade para os cristais de HA de baixa cristalinidade e insolubilidade dos cristais de HA de cristalinidade elevada. A solubilidade e a dissolução são dois factores que estão relacionados, pelo que a dissolução e substituição iónica na formação de novo osso, por meio dos materiais de enxerto, aumentam com o aumento da solubilidade.

Tal como afirma Y.-K. Kim et al. (2011), o grau de cristalização da HA difere consideravelmente, dependendo da área do dente. A porção de esmalte, componente principal da coroa, é composta por HA de elevada cristalinidade. Já a dentina, maioritariamente presente na raiz, é composta por HA de baixa cristalinidade, tal como se verifica a nível ósseo alveolar (Y.-K. Kim, Kim, Yun, et al., 2014).

Por Y.-K. Kim, Kim, Yun, et al. (2014) são também referidos melhores resultados em termos osteocondutivos por parte dos componentes de baixa cristalinidade, nomeadamente por parte da raiz, maioritariamente constituída por dentina. O material caracterizado pela alta cristalinidade, onde se inclui o esmalte, componente principal da coroa, deve ser desprezado, uma vez que não é facilmente reabsorvido e, por isso, não facilita a formação de novo tecido ósseo, interferindo na migração, proliferação e adesão das células vasculares e mesenquimatosas (E. Kim, 2015; Kosinski, 2017).

A partir dos dados obtidos, não é possível fazer extrapolações acerca do grau de cristalização de HA, dependendo da área do dente (coroa ou raiz). Contudo, e tendo em conta os valores anteriormente referidos, no que diz respeito aos valores medianos do rácio cálcio/fósforo de cada um dos grupos analisados [A (coroa triturada) – 2,1458; B (raiz triturada) – 2,2832; C (dente completo triturado) – 2,2557] confirma-se que existem, de facto, diferenças entre o grupo maioritariamente composto por esmalte, componente principal da coroa, e o grupo maioritariamente composto por dentina, componente principal da raiz, estatisticamente significativas ( $p=0,049$ ).

## VI. CONCLUSÃO

O trabalho de investigação verificou, atendendo às hipóteses formuladas, que existe eficácia na eliminação bacteriana quando aplicada a solução básica alcoólica (“*cleanser*”), observável através da destruição e inibição dos microrganismos existentes, desde os períodos de tempo primários protocolados.

Verificou-se, em relação ao rácio cálcio/fósforo, que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos A (coroa triturada), B (raiz triturada) e C (dente completo triturado) estudados, sendo que essa diferença reside entre os grupos A (coroa triturada) e B (dente completo triturado).





## VII. PERSPETIVAS FUTURAS

Futuramente, sugere-se a realização de um estudo experimental “*in vitro*”, de forma a caracterizar a composição inorgânica de um particulado de dentina autógena humana mineralizada, aumentando consideravelmente o tamanho da amostra, e analisando isoladamente os principais tipos de dentes presentes na cavidade oral.

Sugere-se, também, a avaliação clínica, radiográfica e histológica dos mecanismos de cicatrização alveolar com o particulado de diferentes porções dentárias (coroa e raiz).

A realização de estudos “*in vivo*”, como forma de comparação da utilização dos particulados de dentina desmineralizada e mineralizada parece também pertinente.

Poderia também ver-se avaliada a estabilidade implantar, com e sem carga imediata após regeneração alveolar, com material de enxerto autógeno de dentina mineralizada, em tempos de follow-up consideráveis.

Considera-se igualmente relevante a caracterização microbiológica do particulado de dentina obtido pela mesma forma como se processou este estudo, permitindo aferir a eficácia da solução de desinfecção nos vários grupos de microrganismos identificados.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Araújo, M. G., Silva, C. O., Misawa, M., & Sukekava, F. (2015). Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontology 2000*, 68(1), 122–134. <https://doi.org/10.1111/prd.12082>
- Atieh, M., Alsabeeha, N., Payne, A., Duncan, W., Faggion, C., & Esposito, M. (2015). Interventions for replacing missing teeth: alveolar ridge preservation techniques for dental implant site development (Review ). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010176.pub2>
- Avila-Ortiz, G., Elangivan, S., Kramer, K. W. O., Blanchette, D., & Dawson, D. V. (2014). Effect of Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Dental Research*, 93(10), 950–958. <https://doi.org/10.1177/0022034514541127>
- Benic, G. I., & Hämmerle, C. H. F. (2014). Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontology 2000*, 66(1), 13–40. <https://doi.org/10.1111/prd.12039>
- Binderman, I., Hallel, G., & Leretter, M. (2017). Alveolar ridge preservation: Particulate dentin of extracted teeth are optimal for immediate grafting of extracted site. *Dentalife*, 4, 7–12. Retrieved from <https://www.kometabio.com/scientific-background-and-reference>
- Binderman, I., Hallel, G., Nardy, C., Yaffe, A., & Sapoznikov, L. (2014). A Novel Procedure to Process Extracted Teeth for Immediate Grafting of Autogenous Dentin. *Interdisciplinary Medicine and Dental Science*, 2(6), 2–6. <https://doi.org/10.4172/2376-032X.1000154>
- Binderman, I., Hallel, G., Nardy, C., Yaffe, A., & Sapoznikov, L. (2015). Processing extracted teeth for immediate grafting of autogenous dentin. *Implant Practice US*, 8(2). Retrieved from <https://www.implantpracticeus.com/magazine-articles/processing-extracted-teeth-for-immediate-grafting-of-autogenous-dentin/>
- Calvo-Guirado, J. L., Pino, P. C. del, Sapoznikov, L., Ruíz, R. A. D., Dominguez, M. F., & Gehrke, S. A. (2017). A new procedure for processing extracted teeth for immediate grafting in post-extraction sockets. An experimental study in American Fox Hound dogs. *Annals of Anatomy*, 217, 14–23.

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.010>

- Calvo-Guirado, J. L., Val, J. E. M.-S. de, Ramos-Oltra, M. L., Matínez, C. P.-A., Ramírez-Fernández, M. P., Maiquez-Gosálvez, M., ... Delgado-Ruiz, R. A. (2018). The Use of Tooth Particles as a Biomaterial in Post-Extraction Sockets. Experimental Study in Dogs. *Dentistry Journal*, 6(2), 12. <https://doi.org/10.3390/dj6020012>
- Chun, K., Choi, H., & Lee, J. (2014). Comparison of mechanical property and role between enamel and dentin in the human teeth. *Journal of Dental Biomechanics*, 5(0). <https://doi.org/10.1177/1758736014520809>
- Dayakar, M. M., Waheed, A., Bhat, H. S., & Gurple, P. P. (2018). The socket-shield technique and immediate implant placement. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(5), 451–455. [https://doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_240\\_18](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_240_18)
- Elgali, I., Omar, O., Dahlin, C., & Thomsen, P. (2017). Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *European Journal of Oral Sciences*, 125(5), 315–337. <https://doi.org/10.1111/eos.12364>
- Elkayar, A., Elshazly, Y., & Assaad, M. (2009). Properties of Hydroxyapatite from Bovine Teeth. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 2, 31–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.4137/BTRI.S3728>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G., Sasso-cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue : Structure , Function , and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 3, 711–735.
- Grace, S., & Ganapathy, D. (2016). Biomaterials for alveolar socket preservation. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research*, 3(3), 1371–1375.
- Hämmerle, C. H. F., Araújo, M. G., Simin, M., & Araújo, M. G. (2012). Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets. *Clinical Oral Implants Research*, 23(s5), 80–82. <https://doi.org/10.1111/j.1600->

0501.2011.02370.x

- Heymann, H. O., Swift, E. J., & Ritter, A. V. (2013). *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry* (6th ed.). Elsevier.
- Jambhekar, S., Kernen, F., & Bidra, A. S. (2015). Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction : A systematic review of randomized controlled clinical trials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 113(5), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2014.12.009>
- Jo, S. H., Kim, Y.-K., & Choi, Y.-H. (2018). Histological Evaluation of the Healing Process of Various Bone Graft Materials after Engraftment into the Human Body. *Materials*, 11(5), 714. <https://doi.org/10.3390/ma11050714>
- Jung, R. E., Ioannidis, A., Hämmerle, C. H. F., & Thoma, D. S. (2018). Alveolar ridge preservation in the esthetic zone. *Periodontology 2000*, 77(1), 165–175. <https://doi.org/10.1111/prd.12209>
- Khanijou, M., Seriwatanachai, D., Boonsiriseth, K., & Suphangul, S. (2018). Bone graft material derived from extracted tooth: A review literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.07.004>
- Kim, E. (2015). Autogenous fresh demineralized tooth graft prepared at chairside for dental implant. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 37(8). <https://doi.org/10.1186/s40902-015-0009-1>
- Kim, S.-Y., Kim, Y.-K., Park, Y.-H., Park, J.-C., Ku, J.-K., Um, I.-W., & Kim, J.-Y. (2017). Evaluation of the Healing Potential of Demineralized Dentin Matrix Fixed with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Bone Grafts. *Materials*, 10(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ma10091049>
- Kim, Y.-K. (2012). Bone graft material using teeth. *Journal of Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 38(3), 134–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.5125/jkaoms.2012.38.3.134>
- Kim, Y.-K., Kim, S.-G., Bae, J.-H., Um, I.-W., Oh, J.-S., & Jeong, K.-I. (2014). Guided Bone Regeneration Using Autogenous Tooth Bone Graft in Implant Therapy: Case Series. *Implant Dentistry*, 23(2), 138–143. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000046>

- Kim, Y.-K., Kim, S.-G., Byeon, J.-H., Lee, H.-J., Um, I.-U., Lim, S.-C., & Kim, S.-Y. (2010). Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 109(4), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.10.017>
- Kim, Y.-K., Kim, S.-G., Oh, J., Jin, S.-C., Son, J., Kim, S.-Y., & Lim, S.-Y. (2011). Analysis of the Inorganic Component of Autogenous Tooth Bone Graft Material. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(8), 7442–7445. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4857>
- Kim, Y.-K., Kim, S.-G., Yun, P.-Y., Yeo, I.-S., Jin, S.-C., Oh, J.-S., ... Kim, G.-W. (2014). Autogenous teeth used for bone grafting: a comparison with traditional grafting materials. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 117(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.04.018>
- Kim, Y.-K., Lee, J. K., Kim, K.-W., Um, I.-W., & Murata, M. (2013). Healing Mechanism and Clinical Application of Autogenous Tooth Bone Graft Material. In *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications* (pp. 405–435). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/53200>
- Kim, Y.-K., Lee, J., Um, I.-W., Kim, K.-W., Murata, M., Akazawa, T., & Mitsugi, M. (2013). Tooth-derived bone graft material. *The Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 39(3), 103–111. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2013.39.3.103>
- Kim, Y.-K., Lee, J., Yun, J.-Y., Yun, P.-Y., & Um, I.-W. (2014). Comparison of autogenous tooth bone graft and synthetic bone graft materials used for bone resorption around implants after crestal approach sinus lifting: a retrospective study. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 44(5), 216–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.5051/jpis.2014.44.5.216>
- Koga, T., Minamizato, T., Kawai, Y., Miura, K., I, T., Nakatani, Y., ... Asahina, I. (2016). Bone Regeneration Using Dentin Matrix Depends on the Degree of Demineralization and Particle Size. *Plos One*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147235>
- Kosinski, T. (2017). Innovative Socket Grafting Technique in Preparation for Dental Implants. *The Profitable Dentist*. Retrieved from <https://www.kometabio.com/scientific-background-and-reference>

- Lang, N. P., & Lindhe, J. (2010). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (5th ed.). Blackwell Munksgaard.
- Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (6th ed.). WILEY Blackwell.
- Leblebicioglu, B., Salas, M., Ort, Y., Johnson, A., Yildiz, V. O., Kim, D.-G., ... Tatakis, D. N. (2013). Determinants of alveolar ridge preservation differ by anatomic location. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(4), 387–395. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12065>
- Lee, J., Lee, J., & Kim, Y. (2013). Comparative analysis of guided bone regeneration using autogenous tooth bone graft material with and without resorbable membrane. *Journal of Dental Sciences*, 8(3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2013.03.001>
- Moharamzadeh, K., Freeman, C., & Blackwood, K. (2008). Processed bovine dentine as a bone substitute. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(2), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2007.07.209>
- Morjaria, K. R., Wilson, R., & Palmer, R. M. (2012). Bone Healing after Tooth Extraction with or without an Intervention : A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2012.00450.x>
- Nampo, T., Watahiki, J., Enomoto, A., Taguchi, T., Ono, M., Nakano, H., ... Maki, K. (2010). A New Method for Alveolar Bone Repair. *Journal of Periodontology*, 81(9), 1264–1272. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100016>
- Neel, E. A. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., ... Mudera, V. (2016). Demineralization – remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine : classic options , novel strategies , and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(18). <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>
- Ravindran, S., & George, A. (2015). Dentin Matrix Proteins in Bone Tissue Engineering. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 881, 129–142.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-22345-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22345-2_8)

- Rijal, G., & Shin, H.-I. (2017). Human tooth-derived biomaterial as a graft substitute for hard tissue regeneration. *Regenerative Medicine*, 12(3), 263–273. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0147>
- Sarala, C., Chauhan, M., Sandhya, P. S., Dharmendra, C. H., & Mitra, N. (2018). Autogenous Tooth Bone Graft: Ingenious Bone Regeneration Material. *Indian Journal of Dental Sciences*, 10(1), 56–59. <https://doi.org/10.4103/IJDS.IJDS>
- Tabatabaei, F. S., Tatari, S., Samadi, R., & Moharamzadeh, K. (2016). Different methods of dentin processing for application in bone tissue engineering: A systematic review. *Society For Biomaterials Research*, 104(10), 2616–2627. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35790>
- Tang, D., Tare, R. S., Yang, L., Williams, D. F., Ou, K.-L., & Oreffo, R. O. C. (2016). Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, 83, 363–382. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.024>
- Teruel, J. de D., Alcolea, A., Hernández, A., & Ruiz, A. J. O. (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human , bovine , porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60(5), 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>
- Tjäderhane, L., Carrilho, M. R., Breschi, L., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2009). Dentin basic structure and composition — an overview. *Endodontic Topics*, 20(1), 3–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00269.x>
- Um, I., Kim, Y.-K., & Mitsugi, M. (2017). Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 17(2), 120–127. <https://doi.org/10.4103/jips.jips>
- Wiesmann, H.-P., Lüttenberg, B., & Meyer, U. (2007). Tissue Engineering of Bone. In M. Epple & E. Bäuerlein (Eds.), *Handbook of Biomaterialization* (pp. 145–156). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9783527619443>
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., & Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 4(9), 1268–1285. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400760>



## IX. ANEXOS

Comissão de Ética

---



Proc. Interno nº 629

Ex.ma Senhora

**Inês Sofia dos Anjos**

Monte de Caparica, 30 de maio de 2018.

Ex.ma Senhora,

Após as opiniões recebidas dos docentes Prof. Doutor Carlos Zagalo e Prof. Francisco Proença sobre o estudo denominado **"Caracterização da composição inorgânica de um particulado de dentina autógena humana mineralizada – estudo in vitro"** foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

